

UNTERSUCHUNGEN ZUR HÄUFIGKEIT
VON CLOSTRIDIUM DIFFICILE
IN VERSCHIEDENEN ALTERSKLASSEN
DER GESUNDEN BEVÖLKERUNG
IM RAUM MÜNCHEN.
VERGLEICH VERSCHIEDENER
NACHWEISVERFAHREN

Monika Danninger



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0022

Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Friedrich Deinhardt

UNTERSUCHUNGEN ZUR HÄUFIGKEIT VON CLOSTRIDIUM DIFFICILE IN VER-
SCHIEDENEN ALTERSKLASSEN DER GESUNDEN BEVÖLKERUNG IM RAUM MÜNCHEN.
VERGLEICH VERSCHIEDENER NACHWEISVERFAHREN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Monika Danninger

aus

München

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ruckdeschel

Mitberichterstatter: 1) Prof. Dr. F. Deinhardt
2) Prof. Dr. K. Mann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 12. 1986

Herrn Prof. Dr. med. G. Ruckdeschel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau K. Ziegler, Herrn P. Pfaller, Frau E. Werber und Herrn D. Zimmerer für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Untersuchung.

Bei der Organisation dieser Studie und bei der Beschaffung geeigneten Untersuchungsmaterials waren behilflich:

Frau Dr. Frösner, Freising ,
Herr Prof. Metz und die Mitarbeiter des Landesuntersuchungsamtes
für das Gesundheitswesen Südbayern,
die Verwaltungen und das Betreuungspersonal der mitwirkenden
Kinderkrippen, Kindertagesstätten, Schulen und Seniorenwohnheimen.
Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Abschließend danke ich auch allen Teilnehmern an dieser Studie, ohne deren Hilfe die Untersuchung nicht möglich gewesen wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.0	EINLEITUNG-
	Diarrhoe als Nebenwirkung der Antibiotikatherapie 1
1.1	Klinik der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Colitis 1
1.2	Disposition 3
1.3	Morphologie der AAC und PMC 3
1.4	Toxine des C. difficile 4
1.5	Ätiologie und Pathogenese der AAC 5
1.6	Diagnose der AAC und der PMC 6
1.6.1	Endoskopie 6
1.6.2	Bakteriologie, Toxinnachweis 6
1.7.	Differentialdiagnosen der C. difficile-induzierten AAC 7
1.7.1	Antibiotika-assoziierte Diarrhoe ohne Colitis 7
1.7.2	Enterocolitiden mikrobieller Genese 7
1.7.3	Enterocolitiden nicht-mikrobieller Genese 7
1.7.4	Antibiotika-assoziierte hämorrhagische Colitis 7
1.8	Therapie der durch C. difficile induzierten AAC 8
2.0	HISTORISCHER ÜBERBLICK 9
2.1	Erstbeschreibung der PMC 9
2.2	Entdeckung der Erreger der PMC 9
2.2.1	Staphylokokken 9
2.2.2	Clostridium difficile 10
3.0	VERBREITUNG VON C. DIFFICILE IN VERSCHIEDENEN PERSONENGRUPPEN 11
3.1	Häufigkeit von C. difficile bei Gesunden (Tabelle 2) 12
3.2	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten 21
3.2.1	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten ohne Diarrhoe (Tabelle 3) 21
3.2.2	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Diarrhoe 26
3.2.2.1	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit unspezifischer Diarrhoe (Tabelle 4) 26
3.2.2.2	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhoe ohne Entzündungszeichen (Tabelle 5) 32
3.2.2.3	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter unspezifischer Colitis (Tabelle 6) 34
3.2.2.4	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter pseudomembranöser Colitis (Tabelle 7) 35
3.2.2.5	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit postoperativer Diarrhoe (Tabelle 8) 37
3.2.2.6	Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit nekrotisierender Enterokolitis (Tabelle 9) 38

	Seite
3.2.2.7	Häufigkeit von <i>C. difficile</i> bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder M. Crohn (Tabelle 10)
3.2.3	Häufigkeit von <i>C. difficile</i> bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (Tabelle 11)
4.0	NACHWEISMETHODEN
4.1	Nachweis von <i>Clostridium difficile</i>
4.1.1	Feste Nährböden
4.1.1.1	Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA)/ Cycloserin-Fruktose-Agar (CFA) nach GEORGE 1979 (39)
4.1.1.2	Sulphite-Polymyxin-Milk-Agar (SPM) nach DE VOS et al 1982 (127)
4.1.2	Flüssige Nährböden (Anreicherungsmedien)
4.1.2.1	Chopped-Meat-Glucose-Broth (CMG) mit verschiedenen Antibiotika nach HOLST et al 1981 (53)
4.1.2.2	Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Broth (CCFT) mit 0,1% Natriumtaurocholat nach O'FARRELL et al 1983 (91)
4.1.2.3	Taurocholate-Cooked-Meat-Broth (TCM-Broth) und Cycloserin-Cefoxitin-Broth (CC-Broth) nach LEVETT 1985 (70)
4.1.3	Alkoholschockmethode
4.1.3.1	Untersuchung von WILLEY und BARTLETT 1979 (133)
4.1.3.2	Untersuchung von BORRIELLO und HONOUR 1981 (17)
4.1.3.3	Untersuchung von LEVETT 1984 (69)
4.1.4	Nachweis von Stoffwechselprodukten
4.1.4.1	Gaschromatischer Nachweis von p-Kresol auf modifiziertem CCFA nach PHILLIPS und ROGERS 1981 (94)
4.1.4.2	Gaschromatischer Nachweis von Capronsäure und p-Kresol nach Kultur in Norleucin-Tyrosin-Broth nach NUNEZ-MONTIEL et al 1983 (90)
4.1.4.3	Gaschromatischer Nachweis von Isocapronsäure nach Kultivierung in Cooked-Meat-Carbohydrate-Selektiv-Broth nach BUCHANAN 1984 (22)
4.1.4.4	Gaschromatischer Nachweis von Isocapronsäure nach Kultivierung in Gentamycin-Cycloserin-Cefoxitin-Broth nach CARROLL et al 1983 (24)
4.2	Nachweis von Sporen des <i>Clostridium difficile</i>
4.2.1	Untersuchung von WILSON et al 1982 (134)
4.2.2	Untersuchung von WILSON 1983 (135)
4.2.3	Untersuchung von BUGGY et al 1983 (23)
5.0	AUFGABE DER UNTERSUCHUNG
6.0	MATERIAL UND METHODEN
6.1	Rezepte der verwendeten Medien
6.1.1	Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) (Oxoid CM 601)
6.1.2	Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB)
6.1.3	Taurocholat-Cycloserin-cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA)
6.1.4	Peptone-Yeast-Glucose (PYG)
6.1.5	Phosphatpuffer
6.1.6	Zuckerlösungen (Phenolrot broth base)

		Seite
6.2	Geräte zur Inkubation und Identifikation der Kulturen von <i>C. difficile</i>	62
6.3	Bestimmung der Belastbarkeit der CCF-Bouillon	63
6.3.1	Material	63
6.3.2	Untersuchungsmethode	63
6.4	Bestimmung der Empfindlichkeit des Nachweises von <i>C. difficile</i>	64
6.4.1	Material	64
6.4.2	Methoden	64
6.4.2.1	Quantitative Prüfung	64
6.4.2.2	Qualitative Prüfung	65
6.5	Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben	65
6.5.1	Material	65
6.5.2	Methoden	66
6.6	Verbreitung von <i>C. difficile</i> in verschiedenen Altersklassen der gesunden Bevölkerung	66
6.6.1	Material	66
6.6.2	Methoden	69
6.6.2.1	Nachweis von <i>C. difficile</i>	69
6.6.2.2	Bestimmung von <i>C. difficile</i>	69
6.7	Verbreitung von <i>C. difficile</i> unter den Mitarbeitern eines bakteriologischen Labors	71
6.7.1	Material	71
6.7.2	Methoden	71
6.8	Statistische Berechnungen	71
7.0	ERGEBNISSE	72
7.1	Begleitende Versuche zur Methodik	72
7.1.1	Bestimmung der Belastbarkeit der CCF-Bouillon	72
7.1.2	Der Einfluß der eingepfachten Stuhlmenge auf den Nachweis von <i>C. difficile</i>	72
7.1.3	Empfindlichkeit der Nachweismethoden	73
7.1.4	Überlebensdauer von <i>C. difficile</i> bei verschiedenen Umgebungstemperaturen	73
7.2	Häufigkeit des Vorkommens von <i>C. difficile</i> in der gesunden Bevölkerung	76
7.2.1	Kinder	76
7.2.2	Erwachsene	76
7.2.3	Häufigkeit von <i>C. difficile</i> in Abhängigkeit von Geschlecht und Herkunft (Ausländer)	76
7.2.4	Häufigkeit von <i>C. difficile</i> in einer Sondergruppe	79
7.3	Einfluß der verwendeten Kulturmedien -CCFA und CCFB- auf den Nachweis von <i>C. difficile</i>	80
8.0	DISKUSSION	83
8.1	Empfindlichkeit der Nachweismethoden	83
8.2	Vorkommen von <i>C. difficile</i> bei Gesunden	86
8.3	Ökologie und Epidemiologie von <i>C. difficile</i>	90
9.0	ZUSAMMENFASSUNG	95
10.0	LITERATUR	97
11.0	LEBENS LAUF	108

1.0 Einleitung: Diarrhoe als Nebenwirkung der Antibiotika-therapie

Diarrhoen sind eine von Arzt und Patient häufig beobachtete Begleiterscheinung der antibiotischen Therapie und - zumindest bei geringen subjektiven Beschwerden - eine weitgehend akzeptierte Tatsache.

Während der letzten drei Jahrzehnte wurde man jedoch auf eine besonders schwere Form der Antibiotika-induzierten Diarrhoe aufmerksam, die Antibiotika-assoziierte pseudomembranöse Colitis (PMC), deren vermutlich wichtigste Ursache *Clostridium difficile*, ein grampositives, anaerobes Stäbchen mit subterminaler Versporung, erst im Jahre 1978 eindeutig identifiziert wurde.

Pseudomembranen sind nur bei schweren Erkrankungen regelmäßig zu finden; andererseits können pseudomembranöse Colitiden auch andere Ursachen haben.

Es hat sich eingebürgert, die durch Antibiotikatherapie ausgelösten Diarrhoen mit entzündlicher Beteiligung des Colons Antibiotika-assoziierte Colitis oder abgekürzt AAC zu nennen.

Diese Abkürzung soll im folgenden Text vorwiegend gebraucht werden.

1.1 Klinik der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Colitis

Das klinische Bild der AAC reicht, je nach Schwere der Erkrankung, von leichten Diarrhoen bis zur fulminanten Colitis.

Obwohl diese Erkrankung auch ohne vorherige antibiotische Therapie beobachtet wurde (1, 54, 64, 66, 92, 129), treten die Symptome meist zwei bis vier Tage, manchmal auch zwei bis vier Wochen nach Beginn einer Antibiotikatherapie und seltener sogar zwei Wochen nach Absetzen des Antibiotikums auf (75, 130).

In leichteren Fällen klagen die Patienten über ein geblähtes Abdomen, generalisierte abdominelle Krämpfe, Tenesmen, wäßrige Durchfälle, Schwindelgefühl, Abgeschlagenheit, Übelkeit und Erbrechen. Die Erkrankung kann afebril verlaufen, geht meist aber mit Fieber (bis 40°C), Leukozytose (bis 40000/mm³), Linksverschiebung im Differentialblutbild und hoher Blutsenkungsgeschwindigkeit einher (75, 76, 130).

Bei schwerem Verlauf wurden bis zu 40 Stuhlentleerungen täglich, gelegentlich auch mit Blutbeimengungen beschrieben (107).

Der starke intestinale Eiweiß-, Wasser-, und Elektrolytverlust verursacht Hypalbuminämie, Dehydratation und Elektrolytverschiebungen (75, 76).

Eine selten auftretende Steatorrhoe weist auf eine ausgedehnte Dünndarmbeteiligung hin (76).

In sehr schweren Fällen entwickelt sich ein toxisches Krankheitsbild mit Verwirrtheit, Blutdruckabfall und Peritonitis, das zum Tode führen kann.

Auch die Ausbildung eines toxischen Megacolons mit nachfolgender Perforation wurde beobachtet (75, 130).

Die Antibiotika, die eine Colitis auslösen können sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Antimikrobielle Substanzen, die eine AAC hervorrufen können (6)

häufig	Penicilline, Cephalosporine, Lincosamide (Clindamycin, Lincomycin)
seltener	Tetracycline, Erythromycin, Chloramphenicol, Sulfonamide einschließlich Salazosulfapyridin Neomycin, Metronidazol
fraglich	parenterale Aminoglycoside Rifampicin
nicht	Vancomycin Bacitracin

1.2 Disposition

Bevorzugt erkranken multimorbide Patienten in schlechtem Allgemeinzustand, nach Schockzuständen verschiedener Genese oder mit gastrointestinalen Vorerkrankungen, vor allem nach Darmstenosen.

Auch diagnostische Eingriffe, wie Endoskopien und Operationen begünstigen die Erkrankung (58).

Besonders bei gastroenterologischen Patienten und Patienten unter Intensivbehandlung muß mit dem Auftreten einer AAC gerechnet werden (77).

Immunsuppressive und zytostatische Behandlung fördern die Entwicklung ebenfalls ; Zytostatika wurden als auslösende Substanzen beschrieben (78, 61).

Auch onkologische Patienten gehören demnach in den Kreis der besonders Disponierten.

1.3. Morphologie der AAC und PMC

Die PMC wird nach den zu beobachtenden morphologischen Veränderungen in drei Stadien unterteilt (73).

Die leichteste und vermutlich früheste Veränderung, Typ 1, besteht in kleinsten fokalen Nekrosen des Schleimhautoberflächenepithels mit fibrinösem und granulozytärem Exsudat darüber, den sogenannten Gipfelläsionen ("summit lesion"). In diesem Stadium ist die Colitis endoskopisch sehr schwer zu diagnostizieren.

Im zweiten Stadium, Typ 2, haften der Schleimhautoberfläche disseminierte, gelblich-weiße Plaques an, die sogenannten Pseudomembranen, deren Größe von wenigen Millimetern bis zu zwei Zentimetern variiert. Sie bestehen aus Detritus mit fibrinösem oder granulozytärem Exsudat.

Die sich darunter befindlichen Schleimhautkrypten sind partiell nekrotisch bzw. entzündlich destruiert. Die zwischen den manchmal pilzförmigen Pseudomembranen gelegene Schleimhaut ist in diesem Stadium meist nur wenig verändert, kann aber auch einen hyperämischen und ödematösen Aspekt bieten (44, 130).

Die Veränderungen sind in diesem Stadium am ehesten für die PMC charakteristisch.

Das dritte Stadium, Typ 3, entsteht durch Konfluenz der letztlich die gesamte Schleimhautbreite einbeziehenden Nekrosen und Pseudomembranen.

Vor allem nach Abstossung der Pseudomembranen entsteht ein Colitisbild, welches sich auch aus anderer Ursache, wie z.B. als Folge einer Ischämie oder im Verlauf einer Colitis ulcerosa entwickeln kann (75, 44)

Die Diagnosestellung durch Endoskopie ist in diesem Stadium somit sehr schwierig.

1.4. Toxine des C. difficile

Die Virulenz von C. difficile beruht auf der Bildung zweier Exotoxine, die vermutlich stets gemeinsam gebildet werden (132) und die von 80% der Stämme von C. difficile produziert werden (104).

Das eine, jetzt Toxin B genannt, ist ein Zytotoxin (100, 115), das stark schädigend auf verschiedene Kulturzellen wirkt (30) und bei syrischen Hamstern zur hämorrhagischen Caecitis führt (9). Das andere Toxin ist ein Enterotoxin und wird als Toxin A bezeichnet. Es bewirkt im Gegensatz zum Zytotoxin B eine starke Sekretion im Darmschlingentest am Kaninchen, durch Stimulation der Guanylatzyklase, besitzt aber nur sehr geringe Zytotoxizität (104, 112, 115).

Allerdings ist die LD_{50} des Toxin A für Mäuse viel höher als die des Toxin B und die intracaecale Injektion des Enterotoxins ruft bei Hamstern eine schwere Caecitis mit letalem Ausgang hervor, während das Zytotoxin in vergleichbarer Dosis nur eine milde entzündliche Veränderung hervorzurufen vermag (115). Diese beiden Toxine bewirken so auf unterschiedliche Weise eine Schädigung der Colonschleimhaut, wobei das Zytotoxin einen mehr morphogenen Einfluß ausübt (104) und somit wohl hauptsächlich für die Veränderungen, die die PMC charakterisieren, verantwortlich zu machen ist, während das Enterotoxin die Permeabilität im Darm erhöht (132) und damit das Auftreten von Diarrhoen begünstigt.

Kürzlich wurde noch ein drittes Toxin, das wiederholte Aktionspotentialschübe an Ileumschlingen des Kaninchens bewirkt, beschrieben. Dieses Toxin mit einem hohen Molekulargewicht ist ein hitze-labiles Filtrationsprodukt, das von den Toxinen A und B getrennt werden kann (56).

Ein viertes Toxin, das sich noch in den ersten Stadien seiner Beschreibung befindet, bildet eine Flüssigkeitsansammlung in der Ileumschlinge des Kaninchens, ähnlich der durch Cholera-Toxin hervorgerufenen Reaktion.

Dieses Toxin unterscheidet sich von Toxin B durch sein niedriges Molekulargewicht, seine Instabilität und dadurch, daß im Schlingenversuch keine hämorrhagische Flüssigkeit zu beobachten ist (6).

1.5 Ätiologie und Pathogenese der AAC

Clostridium difficile gilt heute als wichtigster, wenn nicht einziger Erreger der AAC.

Unter dem Einfluß der Antibiotika ändert sich das komplexe Gefüge der Darmflora derart, daß eine selektive Vermehrung virulenter, also toxinbildender Clostridien stattfinden kann, entweder weil eine Resistenz gegen das Medikament besteht, wie das bei Clindamycin der Fall ist (104), oder weil andere Bakterien der normalen Darmflora, wie Bifidobakterien, Laktobazillen und Enterokokken eliminiert werden, die die Vermehrung der Clostridien hemmen können (101).

C. difficile kann einerseits ein mengenmäßig unbedeutender Bestandteil der physiologischen Flora sein, es kann jedoch auch durch direkte oder indirekte Übertragung erworben werden und speziell in der Klinik, vor allem über ungenügend desinfizierte Geräte, wie zum Beispiel Endoskope (78, 104), die Patienten kolonisieren.

Für letztere Annahme spricht vor allem das sogenannte Clusteringphänomen, also die örtlich und zeitlich begrenzte Häufung von Erkrankungen an AAC (45).

Auch die Tatsache, daß sich *C. difficile* in der Umgebung von Patienten mit AAC sehr häufig nachweisen läßt, spricht für die exogene Besiedelung in der Klinik.

Die Erreger oder ihre Sporen können in Patientenzimmern mehrere Monate überleben und ließen sich auch an den Händen und im Stuhl asymptomatischen Pflegepersonals nachweisen (61).

1.6 Diagnose der AAC und der PMC

1.6.1 Endoskopie

Wird nach Anamnese oder Klinik eine AAC vermutet, sollte nach Möglichkeit eine Endoskopie durchgeführt werden.

Da in der Regel das gesamte Kolon und Rektum beteiligt ist, gilt als entscheidende Untersuchung die Rekto(sigmoido)skopie mit Biopsie aus den Läsionen (76, 107).

In seltenen Fällen kann das Rektum jedoch unbeteiligt sein, so daß dann auch eine Coloskopie notwendig werden kann (117). Diese belastenden diagnostischen Eingriffe können bei den sehr schwer kranken Patienten jedoch nicht immer vorgenommen werden; in solchen Situationen hilft die ätiologische Diagnose im bakteriologischen Laboratorium.

1.6.2 Bakteriologie, Toxinnachweis

Die bakteriologische Diagnostik der AAC stützt sich auf die Züchtung von *C. difficile* und den Nachweis der Toxine im Stuhl des Patienten (104, 130).

Der Nachweis des zytopathogenen Toxin B gilt als beweisend (130), da Pseudomembranen fehlen oder endoskopisch nicht mehr auffindbar sein können und da bei 97% der Patienten mit bewiesener AAC Toxin B gefunden werden konnte (12).

Das Zytotoxin wird in Zellkulturen nachgewiesen, denen Stuhl- oder Kulturfiltrat zugesetzt wird. Das Toxin verursacht einen zytopathischen Effekt, der durch Antitoxin gegen das Toxin B von *C. difficile* oder gegen Toxin von *C. sordellii* neutralisiert werden kann. Mittels Verdünnung ist eine orientierende Quantifizierung möglich.

Neuerdings steht auch ein Latextest zum Nachweis des Toxin A zur Verfügung. Das Toxin führt zur Agglutination der mit Antitoxin beladenen Latexpartikel (105).

1.7 Differentialdiagnosen der C. difficile-induzierten AAC

1.7.1 Antibiotika-assoziierte Diarrhoe ohne Colitis

Von der AAC sind Diarrhoen abzugrenzen, die klinisch und endoskopisch keine Zeichen einer Colitis aufweisen.

Sie kommen wahrscheinlich durch den kolloidosmotischen Effekt des veränderten Darminhaltes zustande, wenn unter der Wirkung der Antibiotika das Wachstum der bakteriellen Flora gehemmt wird und in der Folge großmolekulare Mukopolysaccharide und Proteine aus endogenen Quellen bakteriell nicht abgebaut werden (74).

1.7.2 Enterocolitiden mikrobieller Genese

Enterocolitiden werden auch durch andere Erreger als C. difficile, so durch Yersinien, Campylobacter, Staphylokokken, Shigellen, Salmonellen und Entamoeben verursacht (13, 60, 73, 76, 136).

Die vier letztgenannten Erreger können auch zur Bildung von Pseudomembranen im Colon führen.

1.7.3 Enterocolitiden nicht-mikrobieller Genese

Entzündungen des Colon, bei denen auch Pseudomembranen nachgewiesen werden konnten, werden außerdem bei Urämie, unter Zytostatikatherapie, bei Schwermetall-Intoxikationen, bei Colonobstruktionen und bei ischämischer Enteropathie beobachtet (13, 73).

Auch der M. Crohn und die Colitis ulcerosa gehören, vor allem dann, wenn endoskopisch keine Pseudomembranen nachweisbar waren, in den Kreis der möglichen Differentialdiagnosen (76).

1.7.4 Antibiotika-assoziierte hämorrhagische Colitis

Als Sonderform der AAC wurde eine hämorrhagische Colitis beschrieben, die vor allem bei jungen Menschen ohne schwere Vorerkrankungen vorkommt.

Sie tritt unter der Therapie mit Penicillinderivaten auf und wird als eine allergisch-ischämische Reaktion der Darmschleimhaut erklärt (76, 120).

1.8 Therapie der durch C. difficile induzierten AAC

Zur Behandlung der AAC werden folgende Maßnahmen empfohlen:

- Der erste Schritt besteht in sofortigem Absetzen des Antibiotikums. Diese Maßnahme führt in leichteren Fällen bereits zu einer sofortigen Besserung der Symptomatik.
- Der zweite Behandlungsschritt ist die parenterale Flüssigkeits-, Volumen- und, falls nötig, auch Albuminsubstitution.
- Die dritte Maßnahme besteht in der oralen Therapie mit Vancomycin in einer Dosierung von 0,5 - 2,0g/d oder in der Behandlung mit Metronidazol (104, 130).

Vancomycin ist die wirksamere Substanz, da resistente Stämme bisher nie beobachtet wurden.

Resistenz des C. difficile gegen Metronidazol wurde in einzelnen Fällen beobachtet (104).

Vancomycin wird auch, im Gegensatz zu Metronidazol, im Intestinaltrakt nicht resorbiert.

Rezidive nach Absetzen von Vancomycin sind in 12% der Fälle beobachtet worden (107), da aber bisher keine Resistenzentwicklung gegen Vancomycin beschrieben wurde, kann die Therapie erneut angewandt werden (130).

Als Ursache für diese Rezidive werden exogene Reinfektion aus der Umgebung des Patienten und endogene Reinfektion durch die Sporenform von C. difficile angegeben, die durch Vancomycin nicht abgetötet werden kann (130).

- Um dispanierte Patienten in der Umgebung nicht zu infizieren, sollten Patienten mit AAC von gefährdeten Patienten, also solchen unter Antibiotika- oder Zytostatikatherapie, nach Möglichkeit isoliert werden.

2.0 Historischer Überblick

2.1 Erstbeschreibung der PMC

Obwohl die pseudomembranöse Colitis erst in den letzten 30 Jahren im Rahmen der antibiotischen Therapie bedeutend wurde, war dieses Krankheitsbild schon um die Jahrhundertwende bekannt.

Im Jahre 1893, also lange vor der Antibiotikaära, beschrieb FINNEY (36) den tödlichen Fall einer "ulcerierenden Colitis mit diphterischen Membranen."

Der Patient starb nach einem bauchchirurgischen Eingriff.

2.2 Entdeckung der Erreger der PMC

2.2.1 Staphylokokken

In der Zeit zwischen 1950 und 1960 wurde Staphylococcus aureus als Erreger der Antibiotika-assoziierten PMC angesehen (3, 49, 96, 97); enterotoxinbildende Stämme von S. aureus konnten aber nicht regelmäßig durch Kultur im Stuhl Erkrankter nachgewiesen werden.

Diese Befunde wurden noch erhärtet durch die Tatsache, daß WOOD et al (136), mit Staphylococcus aureus Enterokolitis bei Chinchillas auslösen und KHAN et al (60) die Staphylokokken-induzierte Colitis mit Vancomycin erfolgreich behandeln konnten.

Einige Autoren, so z.B. DEARING und Mitarbeiter (29), äußerten jedoch schon damals Zweifel an der Richtigkeit dieser Hypothese. Sie fanden, daß Patienten mit der Diagnose "Staphylokokkenenteritis" an anderen Ursachen starben und bei der Autopsie keine intestinalen Läsionen gefunden wurden.

Im Streit der Meinungen war man sich nur darüber einig, daß das histologische Bild dieser Colitis mit einer toxischen Schädigung vereinbar war und daß die Erkrankung mit Antibiotikatherapie (3, 130), oder mit gastrointestinalen Eingriffen (44, 93) in Verbindung stand.

2.2.2 Clostridium difficile

Bis zum Jahre 1977 war die Ätiologie der PMC noch ungeklärt. Da fanden LARSON et al (65) im Stuhl eines 12-jährigen Mädchens mit einer PMC, die durch Penicillin induziert war, ein Toxin, daß in Zellkulturen zytotoxisch wirkte und daß durch ein Antitoxin gegen *Clostridium sordellii* neutralisiert werden konnte.

Weitere Beobachtungen (66) und in der Folge die Arbeit von BARTLETT (7) setzten den darauf einsetzenden Fortschritt in Gang.

BARTLETT (7) zeigte, daß bei Hamstern nach einmaliger Gabe von Lincomycin eine tödlich verlaufende Enterokolitis einsetzte, die sich durch prophylaktische Gabe von Vancomycin verhindern ließ. Auch das durch *C. sordellii*-Antitoxin neutralisierbare Toxin, dessen Ursprung er bereits gemeinsam mit LARSON (66) auf eine Clostridienspezies zurückführte, ließ sich bei den erkrankten Tieren nachweisen.

Es war ebenfalls BARTLETT (9), der, ein Jahr nach der Entdeckung des die AAC auslösenden Toxins, *C. difficile* im Stuhl von Patienten, die an PMC erkrankt waren, nachweisen konnte.

Fast gleichzeitig erkannten auch LARSON et al (67) und GEORGE et al (37) *C. difficile* als den Erreger der AAC; ein grampositives Stäbchenbakterium, das bereits 1935 von HALL und O'TOOLE (50) beschrieben worden war.

Sie hatten es im Stuhl gesunder Neugeborener entdeckt und es, wegen der damals schwierigen Anzüchtung, "Bacillus difficilis" genannt hatten.

Die nachfolgende Forschung befaßte sich dann vorwiegend mit dem 1977 entdeckten Toxin.

Aufgrund der Diskrepanzen in der Charakterisierung dieses Zytotoxins, vermutete BARTLETT (12), daß von *C. difficile* darüberhinaus ein zweites Toxin gebildet wird.

Seine Vermutung bestätigte sich schließlich als TAYLOR et al (115) durch Ultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie und Polyamidgelelektrophorese ein weiteres Toxin, das später Enterotoxin oder Toxin A genannt wurde, isolieren konnte.

Beide Toxine, jetzt Toxin A und B genannt, sind unter Punkt 1.4 genauer beschrieben.

3.0 Verbreitung von C. difficile in verschiedenen Personengruppen

Zur Ermittlung der Häufigkeit von C. difficile bei verschiedenen Personengruppen wurde die verfügbare Literatur recherchiert.

Die Ergebnisse der Auswertung werden in den nachfolgenden Tabelle ausführlich dargestellt.

Alle Zusätze zu Nährböden oder anderen Medien werden in mg/l angegeben.

Verzeichnis der Tabellen:

- 3.1 Häufigkeit von C. difficile bei Gesunden (Tabelle 2)
- 3.2 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten
 - 3.2.1 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten ohne Diarrhoe (Tabelle 3)
 - 3.2.2 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Diarrhoen
 - 3.2.2.1 Häufigkeit von C. difficile bei unspezifischer Diarrhoe (Tabelle 4)
 - 3.2.2.2 Häufigkeit von C. difficile bei Antibiotika-assoziiierter Diarrhoe ohne Entzündungszeichen (Tabelle 5)
 - 3.2.2.3 Häufigkeit von C. difficile bei Antibiotika-assoziiierter unspezifischer Colitis (Tabelle 6)
 - 3.2.2.4 Häufigkeit von C. difficile bei Antibiotika-assoziiierter pseudomembranöser Colitis (Tabelle 7)
 - 3.2.2.5 Häufigkeit von C. difficile bei postoperativer Diarrhoe (Tabelle 8)
 - 3.2.2.6 Häufigkeit von C. difficile bei nekrotisierender Enterokolitis (Tabelle 9)
 - 3.2.2.7 Häufigkeit von C. difficile bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Tabelle 10)
 - 3.2.3 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (Tabelle 11)

3.1 Häufigkeit von *C. difficile* bei Gesunden (Tabelle 2)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
HALL and O'TOOLE (50) 1935	Neugeborene 1-10 Tage alt	10	Dextrose broth Deep iron broth medium Subkultur auf Blut- agar	4/10 Kultur	40	
KELSEY et al (59) 1979	Neugeborene 1-79 Tage alt	17	präduzierter Blut- agar Kanamycin-Blut-Agar Cooked-meat-broth	3/17 Kultur	17,6	
WISCID1 et al (125) 1981	Neugeborene 1-23 Tage alt	45	modifizierter CCFA Brain-heart-infusi- on-Agar mit 5% Schafsblut 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin Toxinnachweis im Stuhl	13/45 Kultur 12/13 Toxin B	29 10,5	Stuhlproben wurden bis 24 h im Kühlschrank auf- bewahrt und bis zur Ver- arbeitung bei -40°C ein- gefroren
DONTA et al (31) 1982	Neugeborene 1-11 Tage alt	105	Toxinachweis im Stuhl	11/105 Toxin B	10,5	
SVEDHAM et al (113) 1982	Neugeborene weniger als 1 Woche alt	100	CCFA nach GEORGE(39) Subkultur auf 5% 5% Pferdeblutagar	1/100 Kultur	1	modifiziertes Stuart- Medium als Transport- medium Stuhlproben wurden inner- halb von 8 h verarbeitet
MALAMOU-LADAS et al (80) 1983	Neugeborene bis 1 Woche alt davon Frühgeborene	51 11/51	präduzierter CCFA nach GEORGE (39)	14/51 Kultur 6/11 Kultur	27,5 54,5	

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
MERIDA et al (83) 1986	Neugeborene bis 7 Tage alt	31	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxi- tin werden 4 mg Cefotaxime verwendet	0/31 Kultur		
	Frühgeborene 29.-35. SSW bis 40 Tage alt	32		5/32 Kultur	16	3/5 erhalten Antibio- tika
LARSON et al (67) 1978	Neugeborene ohne weitere Angaben	8	präreduziertes Selektiv- oder An- reicherungsmedium ohne weitere Angaben	5/8 Kultur	62,5	10-fache Verdünnung der Stuhlproben mit Glycerol-broth-Trans- portmedium Einfrieren bei -70°C
CHANG et al (25) 1979	Neugeborene ohne weitere Angaben	82	Nachweis von Toxin B im Stuhl	2/82 Toxin B	2,4	
BARTLETT et al (11) 1980	Neugeborene ohne weitere Angaben	82	Nachweis von Toxin B im Stuhl	2/82 Toxin B	2,4	
LARSON et al (68) 1982	Neugeborene ohne weitere Angaben	451	CCBAT Blutagar mit 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin 0,1% Natriumtauro- cholat Subkultur auf Blutagar	65/451 Kultur	14,4	Stuhlproben wurden innerhalb von 2 h untersucht Kinder stammen aus 5 verschiedenen Stationen Nachweisrate liegt zwischen 2 und 52% je nach Station
SNYDER et al (109) 1937	Kinder 2 Wochen bis 1 Jahr alt	182	Coagulated blood se- rum (alkaline pyro- gallol) Tryptone water (kei- ne Indolproduktion) Gelatine (langsame Verflüssigung) Milch (Gasbildung) Zuckerfermentation	17/182 Kultur	9,3	

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
SNYDER et al (110) 1940	Kinder 8 Wochen bis 10 Monate alt	22	Methode nach HALL (40) Dextrose broth Deep iron broth medium Subkultur auf Blutagar	10/22 Kultur	45	
TORRES et al (121) 1984	Kinder unter 1 Jahr	22	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxitin wird Cephaloxin verwendet Nachweis von Toxin B im Stuhl	6/22 Kultur 1/22 Toxin B	27,2 4,5	
STARK et al (111) 1982	Kinder unter 1 Jahr 1 Jahr alt 2-4 Jahre alt	13 10 37	modifizierter CCFA 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin in Brain-heart-infusion Agar Subkultur auf Brain-heart-infusion- Agar	7/13 Kultur 3/10 Kultur 1/37 Kultur	53 30 2,7	Kinder unter 1 Jahr waren zeitweise hospitalisiert Kinder im Alter von 1 bis 4 Jahren waren zu Hause Stühle wurde in Transportmedium gegeben (4,5 ml präduzierte 10% Glycerol, 0,5 g Cystein-HCl, 1 mg Resazurin) darüber eine Schicht Paraffin Lagerung bei -60°C bis zur Untersuchung
COOPERSTOCK et al (27) 1983	Kinder 1-52 Wochen alt	107	Nachweis von C. difficile-Antigen im Stuhl mit Gegenstromelektrophorese	43/107 Antigen	40	

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
SVEDHAM et al (113) 1982	Kinder 1 Woche bis 1 Jahr alt 1-6 Jahre alt	100 73	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf 5% Pferdeblutagar	17/100 Kultur 0/73 Kultur	17	modifiziertes Stuart- Medium als Transport- medium Stuhlproben wurden innerhalb von 8 h verarbeitet
VISCIDI et al (125) 1981	Kinder 3-24 Monate alt	23	modifizierter CCFA Brain-heart-infusi- on-Agar mit 5% Schafsblut 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin Toxinnachweis im Stuhl	2/23 Kultur 1/2 Toxin B	8,7 50	Stuhlproben wurden 0-24 h im Kühlschrank aufbewahrt und bis zur Verarbeitung bei -40°C eingefroren
MÖLLBY et al (85) 1983	Kinder 0-5 Jahre alt	210	keine Angaben	32/210	15	
MARDH et al (81) 1982	Kinder unter 2 Jahren	40	CCFA nach GEORGE (39) Toxinnachweis im Stuhl	11/40 Kultur 12/40 Toxin B 8/11 aus Kultur auch To- xin B pos. 8/12 der Toxin B pos. auch Kultur pos.	27,5 30	5/40 der Kinder wurden 4 Wochen vor der Unter- suchung mit Antibiotika behandelt 9/11 der Kinder waren zwischen 2 und 8 Monaten alt feste Stühle wurden mit physiolog. Koch- salzlösung im Verhält- nis 1:1-2 homogenisiert
	über 2 Jahre	5		0/5 Kultur und		

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethoden	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BORRIELLO und LARSON (18) 1981	Kinder ohne weitere Angaben	14	CCFA nach GEORGE (39)	11/14 Kultur	78,5	Kinder wurden mehrmals untersucht
ARONSSON et al (5) 1985	Jugendliche und Erwachsene 12-83 Jahre alt	594	CCFA nach GEORGE (39) Toxinnachweis im Stuhl	11/594 Kultur 0/594 Toxin B	2	
VARXI und AQUINO (123) 1982	Erwachsene über 18 Jahre	21	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar mit Palladiumchlorid	1/21 Kultur	4,7	
STARK et al (111) 1982	Erwachsene 20-40 Jahre alt	28	modifizierter CCFA Brain-heart-infusion- agar mit 500 mg Cycloserin und 16 mg Cefoxitin Subkultur auf Brain-heart-infusion- agar	1/28 Kultur	3,5	Stuhlproben wurden in Transportmedium gegeben (4,5 ml präreduzierte Salzlösung, 10% Glycerol, 0,5 g Cystein-HCl, 1 mg Resazurin) darüber eine Schicht Paraffin Lagerung bei -60°C bis zur Untersuchung
VISCIDI et al (125) 1981	Erwachsene 21-68 Jahre alt	60	modifizierter CCFA Brain-heart-infusion- agar mit 5% Schafsblood 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin Toxinnachweis im Stuhl	0/60 Kultur 0/60 Toxin B		Stuhlproben wurden 0-24h im Kühlschrank aufbewahrt und dann bis zur Verarbeitung bei -40°C eingefroren
DORMAN et al (32) 1982	Erwachsene 22-78 Jahre alt	24	CCFA nach GEORGE (39) Toxinnachweis im Stuhl	0/24 Kultur 0/24 Toxin B		

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
NAKAMURA et al (88) 1981	Erwachsene 22-28 Jahre alt	149	modifizierter CCFA mit 300 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin 10 mg Lysozym Subkultur auf modifizierten CCFA und CCFA ohne Cycloserin und Cefoxitin Toxinnachweis im Stuhl Nachweis von Serum- Antikörpern gegen C. difficile Toxin B	23/149 Kultur	15,4	
				16/149 Toxin B	10,7	
				14/16 Antikörper 7/23 Antikörper	87,5 57,1	
GEORGE et al (38) 1978	60-90 Jahre alt	213	keine Angaben	4/21 der in Kultur und Toxin B neg sind Ak pos.	19	
				15/213 Kultur	7	
				10/213 Toxin B	4,7	
LARSON et al (67) 1978	Erwachsene ohne weitere Angaben	137	keine Angaben	0/213 Antikörper		
				4/137	3	
				0/11 Kultur		10-fache Verdünnung der Stuhlprobe mit Glycerol-Transport- medium Einfrieren bei -70°C
BARTLETT et al (7) 1977	Erwachsene ohne weitere Angaben	63	Toxinnachweis im Stuhl	0/63 Toxin B		

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
CHANG et al (25) 1979	Erwachsene ohne weitere Angaben	29	Toxinnachweis im Stuhl	0/29 Toxin B		
PHILLIPS et al (94) 1981	Erwachsene ohne weitere Angaben	200	modifizierter CCFA mit 250 mg Cycloserin 8 mg Cefoxitin 0,1% p-Hydroxyphe- nylessigsäure Nachweis von p-Kresol mittels Gaschromato- graphie	4/200 Kultur	2	
BORRIELLO und LARSON (18) 1981	Erwachsene ohne weitere Angaben	26	CCFA nach GEORGE (39)	0/26 Kultur		Erwachsene wurden mehrmals untersucht
MÖLLBY et al (85) 1983	Erwachsene ohne weitere Angaben	425	keine Angaben	5/425	1,2	
MARRIE et al (82) 1982	Erwachsene ohne weitere Angaben	54	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf präreduziertem Brain- heart-Infusion-blood- Agar mit 5% Schafsblut 10 mg Vit K ₁ 5 mg Hämin und auf Blutagar mit 5% Schafsblut Toxinnachweis im Stuhl	0/54 Kultur und Toxin B		

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BARTLETT et al (8) 1978	Erwachsene ohne weitere Angaben	51	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/51 Toxin B		
LISHMAN et al (72) 1981	keine Angaben	27	modifizierter CCFA mit 40 g Columbia-Agar 5% Eidotter 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/27 Kultur und Toxin B		
GEORGE et al (41) 1982	keine Angaben	8	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/8 Kultur und Toxin B		
GREENFIELD et al (45) 1983	keine Angaben	70	modifizierter CCFA mit Agarbase 7% defibriniertes Pferdeblut Cycloserin und Cefoxitin (Dosierung nicht angegeben) Nachweis von Toxin B im Stuhl	1/70 Kultur	1,4	

3.2 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten

3.2.1 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten ohne Diarrhoe (Tabelle 3)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
DONTA et al (31) 1982	Neugeborene 1-11 Tage alt	51	Toxinachweis im Stuhl	28/51 Toxin B	54,9	Kinder aus Neugebo- renen-Intensivstation 22/28 erhielten Antibiotika
SHERERTZ et al (106) 1982	Neugeborene ohne weitere Angaben	32	CCFA nach GEORGE (39) Brain-heart-infusi- on-Agar Nachweis von Toxin B im Stuhl	17/32 Kultur 6/17 Toxin B	53,1 35,3	Kinder waren 3 Wochen auf Neugeborenen-Inten- siv- oder - Überwachungsstation
KIM et al (61) 1981	Neugeborene mittleres Alter 1,1 Monate	14	präreduzierter CCFA nach GEORGE (39) Toxinachweis im Stuhl	3/14 Kultur 2/14 Toxin B	21 14,3	Kinder aus Neugebo- renen-Intensiv- oder -Überwachungsstation
	Kinder mittleres Alter 8,9 Monate	21		15/21 Kultur 9/21 Toxin B	71 43	Kinder waren hospi- talisiert
LIBBY et al (71) 1983	Kinder unter 3 Monate	20	Nachweis von Toxin A im Stuhl mittels ELISA und von Toxin B	9/20 Toxin A und Toxin B	45	Kinder wegen Atembe- schwerden auf Intensiv- station 18/20 erhielten Anti- biotika
TORRES et al (121) 1984	Kinder unter 1 Jahr	26	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxitin wird Cephalexin verwendet Nachweis von Toxin B im Stuhl	6/26 Kultur 2/26 Toxin B	20 7,7	Alle 26 Kinder erhiel- ten Antibiotika und waren hospitalisiert

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
ELLIS et al (33) 1984	Kinder unter 2 Jahren	118	modifizierter CCFA mit C. difficile Agar base 10% defibriniertes Pferdeblut 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Anreicherung in cooked-meat-broth Subkultur auf Blutagar Toxin nachweis im Stuhl	39/118 Kultur	33	Alle Kinder waren hospitalisiert 77/118 der Kinder wurden mit Anti- biotika behandelt
VESIKARI et al (124) 1984	Kinder 1-34 Monate alt	52	CCFA nach GEORGE nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	3/39 Toxin B 17/52 Kultur 5/17 Toxin B	7,7 33 29,4	3/39 der Kinder er- hielten Antibiotika Alle Kinder waren hospitalisiert wegen Thypanostomie nach Otitis media und i.v.-Pyelogramm nach Pyelitis es wurde der erste Stuhl im Krankenhaus untersucht 33/52 der Kinder er- hielten Antibiotika in letzter Zeit
SVEDHAM et al (113) 1982	Kinder bis 6 Jahre alt	27	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf 5% Pferdeblutagar	5/27 Kultur	18,5	modifiziertes Stuart-Medium als Transportmedium Stuhlproben wurden 8 h nach Erhalt unter- sucht Alle Kinder in ambulanter Behandlung und unter Antibiotika- Therapie

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
RIETRA et al (99) 1978	Kinder	121	Nachweis von Toxin B im Stuhl	Toxin B		Kinder mit unterschiedlichen Erkrankungen vorwiegend aber Atemwegserkrankungen, Enzephalitis und Epilepsie Alle Kinder in stationärer Behandlung
	0 - 5 Monate	82		17/121	14	
	6 - 11 Monate	123		3/ 82	4	
	12 - 23 Monate	442		3/123	2,1	
	2 - 15 Jahre	442		3/442	0,7	
	über 15 Jahre	442		1/442	0,2	
MERIDA et al (83) 1986	Kinder	32	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxitin wird 4 mg Cefotaxime verwendet	11/32 Kultur	34	Keine Diarrhoe, aber wegen anderer intestinaler Probleme in stationärer Behandlung in stationärer Behandlung, vorwiegend wegen Herzkrankheiten
	6 Tage bis 8 Monate	25		1/25 Kultur	4	
HOLST et al (53) 1981	Kinder und Jugendliche	138	Chopped-meat-glucose (=CMG) CMG mit 500 mg Cycloserin 100 mg Kanamycin CMG mit 500 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar und CCFA	24/138 Kultur	17,4	Stuhlproben wurden 8 h nach Erhalt untersucht 70/138 der Kinder waren hospitalisiert 38/138 der Kinder erhielten Antibiotika
	2 Wochen bis 15 Jahre					
BOENNING et al (15) 1982	Kinder und Jugendliche	135	CCFA nach GEORGE (39)	20/135 Kultur	14,8	Ambulanzpatienten 3/20 der Patienten erhielten Antibiotika
	2 Wochen bis 16 Jahre					

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethoden	Ergebnis n	%	Bemerkungen
VISCIDI et al (126) 1983	Kinder und Erwachsene 1 Woche bis 79 Jahre alt	240	Nachweis von Serum - Antikörpern gegen Toxin A und B mittels ELISA	Pat unter 6 Monaten 11 Toxin A 33 Toxin B Pat. über 6 Monate 66 Toxin B Pat. über 2 Jahre 64 Toxin A Pat. über 2 Jahre 82 haben Antikörper gegen Toxin A und B		Kinder unter 9 Jahren (98) waren hospitali- siert Ältere Kinder und Erwachsene (242) aus unterschied- lichen Fachambu- lanzen
VISCIDI et al (125) 1981	Erwachsene 21 bis 68 Jahre alt	56	modifizierter CCFA Brain-heart-infusion- Agar mit 5% Schafsblut 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	12/56 Kultur 1/12 Toxin B	21 8,3	Stuhlproben wurden 0-24 h im Kühlschrank aufbewahrt und bis zur Untersuchung bei - 40°C eingefroren Alle Patienten waren hospitalisiert und erhielten Antibiotika
NAKAMURA et al (88) 1981	Erwachsene 50-80 Jahre alt	69	modifizierter CCFA mit 300 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin 10 mg Lysozym Subkultur auf modifi- ziertem CCFA Nachweis von Toxin B im Stuhl	11/69 Kultur 8/69 Toxin B	15,9 11,6	Patienten mit cerebro- vasculären Erkran- kungen Alle Patienten in stationärer Behandlung

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BLOCK et al (14) 1985	Erwachsene Frauen	85	Selektivmedium von Difco Toxinnachweis im Stuhl	0/85 Kultur 0/85 Toxin B		Patientinnen aus der gynäkologischen Abteilung, die zur perioperativen Prophylaxe (Sectio, Hysterektomie) Antibiotika er- hielten (nicht Cefoxitin) Patientinnen wegen bevorstehender Sectio oder Hyster- ektomie hospitali- siert keine Antibiotika- therapie
	Erwachsene Frauen	293		0/293 Kultur 0/293 Toxin B		
GERDING et al (42) 1986	Erwachsene ohne weitere Angaben	150	CCFA nach GEORGE (39)	5/150 Kultur	3,3	Patienten, vor- wiegend aus chirur- gischen Stationen Es wurde der erste Stuhl im Kranken- haus untersucht
BARTLETT et al (8) 1978	keine Angaben	14	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/14 Toxin B		Alle Patienten er- hielten Antibiotika
LISHMAN et al (72) 1981	keine Angaben	53	modifizierter CCFA mit 40 g Columbia-Agar 5% Eidotter 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	2/53 Kultur 4/53 Toxin B	3,7 7,5	Alle Patienten er- hielten Antibiotika
GEORGE et al (41) 1982	keine Angaben	13	CCFA nach GEORGE (39) Toxin nachweis im Stuhl	6/13 Kultur 3/13 Toxin B	46 23	Alle Patienten er- hielten Antibiotika

3.2.2 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit Diarrhoe

3.2.2.1 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit unspezifischer Diarrhoe (Tabelle 4)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
SHERERTZ et al (106) 1982	Neugeborene ohne weitere Angaben	5	CCFA nach GEORGE (39) Brain-heart-infusion- Agar Nachweis von Toxin B im Stuhl	5/5 Kultur 4/5 Toxin B	100 80	Kinder waren 3 Wochen auf Neu- geborenen-Intensiv- Station oder - Überwachungs- Station
PHILLIPS und ROGERS (94) 1981	Kinder unter 1 Jahr	16	modifizierter CCFA mit 250 mg Cycloserin 8 mg Cefoxitin 0,1% p-Hydroxyphenyl- essigsäure Nachweis von p-Kresol mittels Gaschromato- graphie	7/16 Kultur	43,6	Patienten deren Stühle zur bakterio- logischen-parasito- untersuchung einge- sandt wurden
TORRES et al (121) 1984	Kinder unter 1 Jahr	22	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxi- tin wird Cephalalexin verwendet Nachweis von Toxin B im Stuhl	1/22 Kultur 0/22 Toxin B	4,5	Patienten erhielten keine Antibiotika Alle Kinder in sta- tionärer Behandlung
MARDH et al (81) 1982	Kinder unter 2 Jahren	48	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	5/48 Kultur 6/48 Toxin B 0/8 Kultur und Toxin B	10,4 12,5	Kinder waren wegen Diarrhoe hospitali- siert 3/6 der Kinder zwischen 2 und 8 Monaten alt
	über 2 Jahren	8				

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
ELLIS et al (33) 1984	Kinder unter 2 Jahren	390	modifizierter CCFA mit C. difficile Agar base 10% defibriniertes Pferdeblut 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Anreicherung in cooked-meat-broth Subkultur auf Blutagar Toxinnachweis im Stuhl	191/390 Kultur oder Toxin B 171/191 Kultur aber Toxin B negativ	49 89,5	Kinder wegen infekti- öser Gastroenteritis hospitalisiert 79/390 erhielten Antibiotika
NASH et al (89) 1982	Kinder unter 2 Jahren	116	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	42/116 Kultur 6/42 Toxin B	36 14,3	Patienten deren Stuhlproben zur Mikrobiologischen Untersuchung ein- gesandt wurden
HYAMS et al (55) 1985	Kinder 5 - 19 Monate	23	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/23		Alle Patienten waren hospitalisiert 18/23 wegen Colon irritabile 5/23 wegen Laktose- seintoleranz
VESICARI et al (124) 1984	Kinder bis 26 Monate	52	CCFA nach GEORGE (39) Toxinachweis im Stuhl	11/52 Kultur 1/11 Toxin B	21 9	Patienten wegen Diarrhoe hospita- lisiert 29/52 erhielten Antibiotika
MERIDA et al (83) 1986	Kinder 3 Tage bis 6 Monate	27	modifizierter CCFA anstelle von Cefoxi- tin wird 4 mg Cefo- taxime verwendet	16/27 Kultur	59	Kinder wegen akuter Diarrhoe in statio- näher Behandlung

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
SVEDHAM et al (113) 1982	Kinder bis 6 Jahre	56	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf 5% Pferdeblutagar	10/56 Kultur	17,8	modifiziertes Stuart-Medium als Transportmedium Stühle wurden 8 h nach Erhalt unter- sucht ambulante Patienten Patienten erhielten keine Antibiotika
WELCH et al (131) 1982	Kinder ohne weitere Angaben	217	keine Angaben	37/217	17	Patienten deren Stühle zur bakterio- logischen und para- sitologischen Unter- suchung eingesandt wurden
HOLST et al (53) 1981	Kinder und Jugendliche 2 Wochen bis 15 Jahre	80	Chopped-meat-glucose (=CMG) CMG mit 500 mg Cycloserin 100 mg Kanamycin CMG mit 500 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar und CCFA	15/80 Kultur	23,8	Stuhlproben wurden 6-8 h nach Erhalt untersucht 7/80 der Patienten wurden mit Antibio- tika behandelt 41/80 der Patienten in stationärer Behandlung
BOENNING et al (15) 1982	Kinder und Jugendliche 2 Wochen bis 16 Jahre alt	171	CCFA nach GEORGE (39)	12/171 Kultur	7	ambulante Patienten 4/12 der Patienten erhielten Antibioti- ka

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
THOMPSON et al (119) 1983	Kinder und Jugendliche 4 Tage bis 19 Jahre	208	Toxinnachweis im Stuhl	18/208 Toxin B	8,6	14/18 (78%) der Kinder sind unter 2 Jahre 63/208 sind hospita- lisiert 67/208 erhielten Antibiotika
PHILLIPS und ROGERS (94) 1981	Patienten über 1 Jahr	84	modifizierter CCFA mit 250 mg Cycloserin 8 mg Cefoxitin 0,1% p-Hydroxyphen- yllessigsäure Nachweis von p-Kresol mittels Gaschromato- graphie	4/84 Kultur	4,8	Patienten deren Stühle zur bakt.- parasit. Untersuchung eingesandt wurden
NASH et al (89) 1982	Patienten über 2 Jahre	597	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar Nachweis von Toxin B im Stuhl	25/597 Kultur 4/25 Toxin B	4,2 16	Patienten deren Stühle zur mikrobiologischen Untersuchung einge- sandt wurden
BRETTLE et al (21) 1982	Erwachsene 19 bis 80 Jahre	154	CCFA nach GEORGE (39) Anreicherung in Robertsons Cooked- meat-broth Subkultur auf CCFA Toxinnachweis im Stuhl	19/154 Kultur 6/19 Toxin B	12,3 31,5	Alle Patienten waren hospitalisiert 7/19 der Patienten erhielten Antibiotika
ARONSSON et al (5) 1985	Erwachsene 18 bis 93 Jahre	398	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	11/398 Kultur 4/398 Toxin B	2,8 1	Alle Patienten waren hospitalisiert erhielten aber keine Antibiotika

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
MARRIE et al (82) 1982	Patienten durchschnittl. Lebensalter 23,2 Jahre	22	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf präreduziertem Brain- heart-infusion-blood- Agar mit 5% Schafsblut 10 mg Vit K ₁ 5 mg Hämin und auf 5% Schafsblutagar Nachweis von Toxin B im Stuhl	1/22 Kultur	4,5	Patienten aus Praxis 15/22 mit funktion- ellen Darmstörungen 3/22 mit entzünd- lichen Darmkrankheiten 2/22 mit akuter Gastroenteritis 1/22 mit Postgastrek- tomie-Syndrom 1/22 mit Divertiku- litis
VARKI und AQUINO (123) 1982	Kinder ohne weitere Angaben Erwachsene ohne weitere Angaben	10 72	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar mit Palladiumchlorid	2/10 Kultur 8/72 Kultur	20 11,11	stationäre Patienten Patienten hatten keine entzündlichen Darm- krankheiten und er- hielten keine Antibio- tika
GILLIGAN et al (43) 1981	Erwachsene ohne weitere Angaben	161	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	19/161 Kultur oder Toxin B	11,9	Patienten wurden mehr- mals untersucht ambulante und statio- näre Patienten
GERDING et al (42) 1986	Erwachsene	504	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	149/504 Kultur oder Toxin B	29,5	17/19 der Patienten erhielten Antibiotika Patienten vor allem aus chirurgischen Stationen viele erhielten Antibiotika (keine genauen Angaben)
BARTLETT et al (10) 1979	keine Angaben	56	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/56 Toxin B		Patienten erhielten keine Antibiotika

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethoden	Ergebnis n	%	Bemerkungen
CHANG et al (25) 1979	keine Angaben	137	Toxinnachweis im Stuhl	3/137 Toxin B	2	Patienten erhielten keine Antibiotika
BARTLETT (11) 1980	keine Angaben	158	CCFA nach GEORGE (39)	3/158 Kultur	3	Patienten erhielten keine Antibiotika
BORRIELLO und LARSON (18) 1981	keine Angaben	30	CCFA nach GEORGE (39)	0/30 Kultur		
GREENFIELD et al (45) 1983	keine Angaben	126	modifizierter CCFA mit Agarbase 7% Pferdeblut Cycloserin und Cef- oxitin (Dosis nicht angegeben) Toxinnachweis im Stuhl	15/126 Kultur oder Toxin B	11,9	Patienten wurden mehrmals unter- sucht stationäre Patienten
LISHMAN et al (72) 1981	keine Angaben	49	modifizierter CCFA mit 5% Eigelb 40 g Columbia-Agar 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/49 Kultur und Toxin B		Patienten wurden nicht mit Antibio- tika behandelt

3.2.2.2 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhoe
ohne Entzündungszeichen (Tabelle 5)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
TORRES et al (121) 1984	Kinder unter 1 Jahr	52	modifizierter CCFA anstelle von Gefoxi- tin wird Cephalaxin verwendet Nachweis von Toxin B im Stuhl	12/52 Kultur	23	Alle Kinder waren hospitalisiert
VISCIDI et al (125) 1984	Patienten über 5 Jahre	85	modifizierter CCFA Brain-heart-infusion- Agar mit 5% Schafsblut 250 mg Cycloserin 10 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	13/85 Kultur	15	Stuhlproben wurden gefroren eingesandt und 4 Tage nach Er- halt untersucht stationäre Patienten
ARONSSON et al (5) 1985	Kinder und Erwachsene 3 Wochen bis 101 Jahre	4793	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/85 Toxin B		
			Nachweis von Toxin B im Stuhl	873/4793 Toxin B	18,2	Stühle wurden zur bakteriolog.-para- sitologischen Unter- suchung eingesandt
BLOCK et al (14) 1985	Erwachsene Frauen	162	Selektivmedium (Difco) Nachweis von Toxin B im Stuhl	12/162 Kultur	7,4	Patientinnen aus gynakologischer Station, die zur perioperativen Prophylaxe (Sectio, Hysterektomie) Cefoxitin erhielten
				11/12 Toxin B	91,6	
MÖLLBY et al (85) 1983	keine Angaben	545	keine Angaben	12/545 Kultur	2,2	

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BARTLETT et al (11) 1980	keine Angaben	137	Nachweis von Toxin B im Stuhl	37/137 Toxin B	27	
GEORGE et al (41) 1982	keine Angaben	108	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	34/108 Kultur 20/108 Toxin B	31,5 18,5	Patienten waren hospitalisiert
BARTLETT et al (8) 1978	keine Angaben	47	Nachweis von Toxin B im Stuhl	3/47 Toxin B	6,4	
CHANG et al (25) 1979	keine Angaben	49	Nachweis von Toxin B im Stuhl	8/49 Toxin B	16,3	
BARTLETT et al (9) 1978	keine Angaben	54	Nachweis von Toxin B im Stuhl	10/54 Toxin B	18,5	

3.2.2.3 Häufigkeit von C. difficile bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter unspezifischer Colitis (Tabelle 6)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
MÖLLBY et al (84) 1980	Patienten 11-90 Jahre alt	132	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	14/132 Kultur 35/132 Toxin B	11 27	Patienten aus ver- schiedenen Kranken- häusern
BARTLETT et al (8) 1978	keine Angaben	16	Nachweis von Toxin B im Stuhl	6/16 Toxin B	37,5	
BARTLETT et al (10) 1979	keine Angaben	78	Nachweis von Toxin B im Stuhl	12/78 Toxin B	15	
CHANG et al (25) 1979	keine Angaben	16	Nachweis von Toxin B im Stuhl	6/16 Toxin B	37,5	
LISHMAN et al (72) 1981	keine Angaben	53	modifizierter CCFA mit 40 g Columbia-Agar 5% Eidotter 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	9/53 Kultur 10/53 Toxin B	17 18,8	bei 1/10 wurde später PMC diagnostiziert
GEORGE et al (41) 1982	keine Angaben	25	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	15/25 Kultur 8/25 Toxin B	60 32	Patienten aus ver- schiedenen Kranken- häusern

3.2.2.4 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter pseudomembranöser Colitis (Tabelle 7)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
GEORGE et al (40) 1982	Patienten 9-83 Jahre alt	30	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	27/30 Kultur und Toxin B	90	Patienten waren hospitalisiert Stühle wurden bis zur Untersuchung eingefroren
LARSON und PRICE (66) 1977	Patienten 12-86 Jahre alt	9	Nachweis von Toxin B im Stuhl	9/9 Toxin B	100	Patienten waren hospitalisiert es wurde kein Toxinneutrali- sationstest durch- geführt
BARTLETT et al (8) 1978	keine Angaben	27	Nachweis von Toxin B im Stuhl	26/27 Toxin B	96,3	
LARSON et al (67) 1978	keine Angaben	5	präreduziertes Selektiv- oder Anreicherungs- medium ohne weitere Angaben Nachweis von Toxin B im Stuhl	5/5 Kultur 4/5 Toxin B	100 80	Verwendung von Glycerol-broth- Transportmedium und einfrieren bei - 70°C Patienten waren hospitalisiert
GEORGE et al (37) 1978	keine Angaben	8	Blutagar mit 70 mg Kanamycin- Sulphat oder 10 mg Nalidixinsäure	8/8 Kultur	100	
BARTLETT et al (9) 1978	keine Angaben	5	Brucella-base-blood- agar mit 10 mg Menadione und 10 mg Clindamycin- hydrochlorid	4/5 Kultur	80	Patienten waren hospitalisiert

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BARTLETT et al (10) 1979	keine Angaben	43	Nachweis von Toxin B im Stuhl	42/43 Toxin B	97,6	
CHANG et al (25) 1979	keine Angaben	53	Nachweis von Toxin B im Stuhl	51/53 Toxin B	96,2	
BARTLETT et al (11) 1980	keine Angaben	71	Nachweis von Toxin B im Stuhl	68/71 Toxin B	97	
GEORGE et al (41) 1982	keine Angaben	35	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	31/35 Kultur 29/35 Toxin B	89 82,2	Patienten waren hospitalisiert

3.2.2.5 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit postoperativer Diarrhoe (Tabelle 8)

-37-

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
ROSENBERG et al (103) 1984	Erwachsene 21 bis 96 Jahre	691	Nachweis von Toxin B im Stuhl	75/691 Toxin B	10,8	22/75 der Patienten erhielten Antibiotika
LARSON et al (67) 1978	keine Angaben	10	präreduziertes Selektiv- oder Anreicherungsmedium ohne nähere Angaben	0/10 Kultur		Patienten hatten Dickdarmkarzinom 10-fache Verdünnung der Stühle mit Glycerol-broth- Transportmedium und einfrieren bei -70°C
KEIGHLEY et al (58) 1978	keine Angaben	58	Nachweis von Toxin B im Stuhl	9/58 Toxin B	15	
KEIGHLEY et al (57) 1978	keine Angaben	44	Blutagar mit Kanamycin (keine Dosisangabe Nachweis von Toxin B im Stuhl	21/44 Kultur oder Toxin B	47,7	
GEORGE et al (37) 1978	keine Angaben	20	Blutagar mit 70 mg Kanamycin- sulphat oder 10 mg Nalidixinsäure	7/20 Kultur	35	Patienten mit gastrointestinalen Operationen

3.2.2.6 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit nekrotisierender Enterokolitis (Tabelle 9)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BARTLETT et al (8) 1978	Neugeborene ohne weitere Angaben	24	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/24 Toxin B		Kinder aus ver- schiedenen Kranken- häusern
BORRIELLO und LARSON (18) 1981	Kinder ohne weitere Angaben	7	CCFA nach GEORGE (39)	3/7 Kultur	43	Kinder wurden mehrmals unter- sucht

3.2.2.7 Häufigkeit von *C. difficile* bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Tabelle 10)

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
HYAMS et al (55) 1985	Kinder mit M. Crohn 4-16 Monate alt mit Colitis ulcerosa 5-19 Monate alt	32 12	Nachweis von Toxin B im Stuhl	3/32 Toxin B 0/12 Toxin B	9,4	stationäre Patienten
TRNKA und LAMONT (122) 1991	Kinder und Erwachsene mit M. Crohn 12-68 Jahre alt mit Colitis ulcerosa 9-72 Jahre alt	24 35	Nachweis von Toxin B im Stuhl	7/24 Toxin B 4/35 Toxin B	29,1 11,4	12/24 der Patienten waren hospitalisiert 14/35 der Patienten waren hospitalisiert Toxin B konnte nur bei schwerem Krank- heitsverlauf nach- gewiesen werden
DORMAN et al (32) 1982	Jugendliche und Erwachsene mit inaktivem M. Crohn 15-74 Jahre alt	50	CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	4/50 Kultur 0/50 Toxin B	8	ambulante Patienten
LARSON und PRICE (66) 1977	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcero- sa	7	Nachweis von Toxin B im Stuhl	1/7 Toxin B	14,3	Es wurde kein Toxinneutralisations- test durchgeführt
LARSON et al (67) 1978	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcero- sa	10	präreduziertes Selektiv- oder Anrei- cherungsmedium ohne weitere Angaben Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/10 Kultur und Toxin B		Verwendung von Glycerol-broth- Transportmedium und einfrieren bei -70°C

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
BARTLETT et al (8) 1978	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcerosa	10	Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/10 Toxin B		
BORRIELLO und LARSON (18) 1981	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcerosa oder M. Crohn	7	CCFA nach GEORGE (39)	3/7 Kultur	43	
LISHMAN et al (72) 1981	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcerosa M. Crohn	26 8	modifizierter CCFA mit 40 g Columbia-Agar 5% Eidotter 500 mg Cycloserin 16 mg Cefoxitin Nachweis von Toxin B im Stuhl	0/26 Kultur und Toxin B 0/8 Kultur und Toxin B		
VARKI und AQUINO (123) 1982	keine Angaben Patienten mit Colitis ulcerosa oder M. Crohn	10	CCFA nach GEORGE (39) Subkultur auf Blutagar mit Palladiumchlorid	2/10 Kultur	20	stationäre Patienten der Großteil der Patienten wurde mit Azulfidine behandelt
GREENFIELD et al (45) 1983	keine Angaben Patienten mit M. Crohn Colitis ulcerosa	114 219	modifizierter CCFA mit Agarbase 7% Pferdeblut und Cycloserin und Cefoxitin (ohne Dosierung) Nachweis von Toxin B im Stuhl	15/114 Kultur oder Toxin B 30/219 Kultur oder Toxin B	13,2 13,7	ambulante Patienten

Autoren	Altersgruppe	Zahl	Nachweismethode	Ergebnis n	%	Bemerkungen
KIM et al (64) 1981	Keine Angaben onkologische Patienten	43	präreduzierter CCFA nach GEORGE (39) Nachweis von Toxin B im Stuhl	17/43 Kultur 4/17 Toxin B	39,5 23,5	stationäre Patienten viele wurden mit Antibiotika behandelt
MALAMOU-LADAS et al (80) 1983	keine Angaben onkologische Patienten (Leukämie) urologische Patienten	27 31	präreduzierter CCFA nach GEORGE (39)	6/27 Kultur 1/31 kultur	22,2 3,2	stationäre Patienten keiner hatte Diarrhoe

4.0 Nachweismethoden

4.1 Nachweis von Clostridium difficile

4.1.1 Feste Nährböden

4.1.1.1 Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) / Cycloserin-Fruktose-Agar (CFA) nach GEORGE 1979 (39)

Proteose peptone No 2 (Difco)	40	g
Na ₂ HPO ₄	5	g
KH ₂ PO ₄	1	g
NaCl	2	g
MgSO ₄ (wasserfrei)	0,1	g
Fruktose	6	g
Agar (BBL)	2	g
Neutralrot in Äthanol (1%)	3	ml
Aqua dest.	1000	ml

15 Min. bei 121°C sterilisieren und nach Abkühlung auf 50°C
Zugabe von

Cycloserin	500	µg/ml
Cefoxitin	16	µg/ml
Eigelb suspension in Salzlösung (50%)	5	ml

Der Cycloserin-Fruktose-Agar (CFA) wird wie CCFA hergestellt,
jedoch ohne Cefoxitin.

Erprobung:

Die beiden Nährböden wurden an Stämmen von C. difficile und
an tiefgefrorenen Stuhlproben getestet.

Darüberhinaus wurden sie mit folgenden Selektivnährböden

- Clostrisel-Agar (BBL)
- Reinforced Clostridial-Agar (BBL) mit 0,2% p-Kresol
- Eidotter-Neomycin-Agar,
der in anaerobem Milieu mit hitzegeschockten Proben
(80°C über 10 Min. im Wasserbad) beimpft wurde

und mit dem nicht selektiven

- Brucella-Agar

mit Hämin, Vit K₁, und 5% Schafsblut
verglichen.

Alle Nährböden wurden vor der Verwendung übernacht vorreduziert.

Ergebnisse:

Die Nachweisgrenze des CCFA lag bei 2×10^3 KBE *C. difficile* bei einer Gesamtzahl von 6×10^{10} /g Stuhl.

Der CFA und der nicht selektive Brucella-Agar wurden von der Begleitflora stark überwuchert.

C. difficile konnte auf Clostrisel-Agar und Reinforced Clostridial-Agar nicht gezüchtet werden.

Hitzebehandlung (80°C über 10 Min. im Wasserbad) vor dem Ausstreichen auf Eidotter-Neomycin-Agar senkt die Nachweisrate um 4-5 $\log_{10}$ -Stufen.

4.1.1.2 Sulphite-Polymyxin-Milk-Agar (SPM) nach de VOS et al, 1982 (127)

Trypton (Difco)	15	g
Hefeextrakt	10	g
Eisen-(III)-Zitrat	0,5	g
Bacto-Agar (Difco)	18	g
Aqua dest.	930	ml

15 Min. bei 121°C sterilisieren und auf 56°C abkühlen lassen, dann Zugabe von

Na_2SO_3 (5%), filtersterilisiert	5	ml
Colistinsulfat (0,1%)	10	ml
Neutralrot (1%)	4	ml
sterile Kuhmilch	50	ml
pH 7,0		

Erprobung:

Prüfung an verschiedenen Clostridien-Stämmen (*C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. paraputrificum*, *C. putrificum*, *C. sordellii*) und an Stuhlproben, denen diese Stämme zugesetzt wurden.

Der Sulphite-Polymyxin-Milk-Agar wurde mit

- Reinforced Clostridial-Agar (RCA) (Oxoid CM 101) mit 7,5% defibriniertem Schafsblut,
- Sulphite-Polymyxin-Sulfadiazin-Agar (SPS), bei dem Polymyxin B durch Colistinsulfat ersetzt wurde,
- Sulphite-Polymyxin-Agar (SP), der wie SPS hergestellt wurde, aber ohne Sulfadiazine und mit
- Trypticase-Sulphite-Neomycin-Agar (TSN) verglichen.

Alle Nährböden wurden wöchentlich frisch hergestellt und in anaerober Atmosphäre bei 4°C aufbewahrt.

Ergebnisse:

Bei Einsaat von *C. difficile* in einer Menge von 5×10^3 KBE/ml Stuhlsuspension wurden auf

SPM 4×10^3 KBE/ml Stuhlsuspension, auf

SPS 2×10^2 KBE/ml Stuhlsuspension und auf

SP 2×10^3 KBE/ml Stuhlsuspension wieder gefunden.

Auf RCA konnte *C. difficile* nur nachgewiesen werden, wenn mindestens 5×10^5 /ml Stuhlsuspension vorhanden waren.

TSN eignet sich nicht zum Nachweis von *C. difficile*, weil auf diesem Nährboden weniger als 1% der eingesäten Kolonien wieder gefunden wurden.

C. difficile konnte in Mengen von mindestens 2×10^3 KBE/ml Stuhlsuspension auf SPM noch regelmäßig gefunden werden, wenn 5×10^8 KBE *Escherichia coli* und 5×10^7 KBE *Streptococcus faecalis* gleichzeitig inokuliert wurden.

Bei Einsaat der gleichen Kolonienzahlen konnte auf SPS nur 45% und auf SP nur 20% der vorher zugesetzten *C. difficile* Kolonien wieder gefunden werden.

C. difficile war unter diesen Bedingungen auf RCA nur nachzuweisen, wenn mindestens 2×10^6 KBE/ml Stuhlsuspension vorhanden waren.

Außer den verschiedenen genannten Clostridienspezies wuchsen nur *Streptococcus faecalis* und *Escherichia coli* auf SPM.

4.1.2 Flüssige Nährböden (Anreicherungsmedien)

4.1.2.1 Chopped-Meat-Glucose-Broth (CMG) mit verschiedenen Antibiotika nach HOLST et al 1981 (53)

Chopped-Meat-Glucose-Broth (CMG) (übliche Rezeptur)

mit Cycloserin 500 µg/ml

Kanamycin 100 µg/ml

Chopped-Meat-Glucose-Broth (CMG) (übliche Rezeptur)

mit Cycloserin 500 µg/ml

Cefoxitin 10 µg/ml

Erprobung:

Testung an Stuhlproben, Vaginalabstrichen und Proben aus der unbelebten Umgebung.

Ergebnisse:

Es ergab sich keine signifikante Differenz zwischen den beiden Anreicherungsmedien und CCFA.

CMG mit Cefoxitin und CCFA bringen gleiche Ergebnisse, während CMG mit Kanamycin oft von Clostridium sporogenes überschwärmt wurde.

4.1.2.2 Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Broth (CCFT)

0,1% Natriumtaurocholat nach O'FARRELL et al 1983 (91)

Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Medium (Oxoid)

ist mit

1g/l Natriumtaurocholat versetzt.

Erprobung:

Testung an Stuhlproben von Neugeborenen und an Vaginalabstrichen. Die beimpfte CCFT-Broth wurde nach Inkubation über 48h oder über 7 Tage auf Blutagar ausgestrichen.

Die CCFT-Broth wurde mit den festen Nährböden

- Reinforced Clostridial-Agar (RCA) (Oxoid) mit 0,2% p-Cresol und mit

- Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Blood-Agar (CCF-Agar) (Oxoid) verglichen.

Ergebnisse:

In den Vaginalabstrichen erhöht das Anreicherungsmedium die Nachweisrate um rund das Zehnfache.

Bei den Stuhlproben Neugeborener war kein signifikanter Unterschied zwischen CCFT-Broth und CCF-Agar (Oxoid) feststellbar.

Auf RCA (Oxoid) wurde C. difficile in keinem Fall nachgewiesen.

4.1.2.3 Taurocholate-Cooked-Meat-Broth (TCM-Broth) und

Cycloserin-Cefoxitin-Broth (CC-Broth)

nach LEVETT 1985 (70)

nicht selektives Basismedium:

Cooked-Meat-Broth (CMB)

Dried meat granules	37,5	g/l
---------------------	------	-----

Brain-heart-infusion	17,5	g/l
----------------------	------	-----

Hefeextrakt (Oxoid)	6,0	g/l
---------------------	-----	-----

Hämin/Menadione Lösung (Gibco)	10,0	ml/l
--------------------------------	------	------

15 Min. bei 121°C sterilisieren

selektive Medien:

- Taurocholate-Cooked-Meat-Broth (TCM-Broth)

Zu CMB wird nach der Sterilisation

1 g/l Natriumtaurocholat (BDH) zugegeben.

- Cycloserin-Cefoxitin-Broth (CC-Broth)

Zu CMB werden nach der Sterilisation

250 mg/l Cycloserin und

8 mg/l Cefoxitin zugegeben.

Erprobung:

Testung an Stuhlproben von 104 Patienten mit Antibiotika-assoziierten Diarrhoe.

Alle Stühle wurden vorher mit Alkohol (Alkoholschock) behandelt.

Die drei verschiedenen Anreicherungsmedien wurden mit den vorbehandelten Stühlen beimpft und bei 37°C über 5 Tage in anaerobem Milieu bebrütet, dann wurden Subkulturen auf modifiziertem CCFA (Siehe 4.1.3.3) angelegt.

Zum Vergleich wurde auch der modifizierte CCFA mit vorbehandeltem Stuhl beimpft (Siehe 4.1.3.3)

Ergebnisse:

Die beiden Anreicherungsmedien erhöhen die Nachweisrate auf das Doppelte.

Die CC-Broth war signifikant schlechter als die TCM-Broth oder die nicht-selektive CM-Broth.

4.1.3 Alkoholschockmethode

4.1.3.1 Untersuchung von WILLEY und BARTLETT 1979 (133)

WILLEY und BARTLETT untersuchten die Wirkung von 100 %igem Äthanol auf die Nachweisrate von *C. difficile* aus Stuhlproben, die *C. difficile* enthielten und verglichen dabei mehrere Nährböden miteinander.

Für den Alkoholschock wird 100%-iges Äthanol im Verhältnis 1:1 mit der zu untersuchenden Probe vermengt.

Das Gemisch wird 1h in anaerober Umgebung belassen.

Folgende Nährmedien wurden beimpft:

- modifizierter CCFA

Brain-Heart-Infusion-Agar (BBL)

15 Min. bei 121°C autoklavieren

nach Abkühlung auf 45°C Zugabe von

Cycloserin	250	mg /l
------------	-----	-------

Cefoxitin	10	mg /l
-----------	----	-------

Alsever Sheep Blood	50	ml /l
---------------------	----	-------

- Reinforced Clostridial Broth mit 0,2% Parakresol (RCB)

- Brucella Base Blood Agar (Scott Laboratories)

Erprobung:

RCB wurde mit positivem Stuhl, unbehandelt und nach Alkoholschock, beimpft.

Nach Inkubation über 5 Tage in anaerober Atmosphäre bei 35°C erfolgte die Subkultivierung auf modifiziertem CCFA.

Brucella Blood Agar und modifizierter CCFA wurden auf die gleiche Weise jeweils vor und nach Alkoholschock beimpft.

Die Proben wurden dann in anaerobem Milieu bei 35°C zwei bis drei Tage bebrütet.

Ergebnisse:

Die Alkoholschockmethode bringt keine Vorteile auf Selektivnährböden (mod. CCFA und RCB), jedoch einen geringen Vorteil bei dem nichtselektiven Brucella Blood Agar, da die Gesamtkeimzahl und damit das Überwachsen der Kolonien von *C. difficile* vermindert wird. Auf dem modifizierten CCFA konnte *C. difficile* in allen positiven Proben nachgewiesen werden.

RCB mit Parakresol war weniger sensitiv und selektiv als der modifizierte CCFA.

4.1.3.2 Untersuchung von BORRIELLO und HONOUR 1981 (17)

Die Untersuchung von BORRIELLO und HONOUR besteht aus 2 Teilversuchen, dem Vergleich der Nachweisraten und der Prüfung der Wirkung des Alkoholschocks.

Die folgenden Nährböden wurden verwendet:

- Brain-Heart-Infusion-Agar (BHIA)		
Brain-heart-infusion (Difco)	37	g
Hefeextrakt (Difco)	5	g
Häminlösung	1	ml
Vitamin K ₁ -Lösung	1	ml
L-Cystein HCl	0,5	g
Natriumformaldehydsulfoxylat	0,3	g
New Zealand Agar	20	g
defibriniertes Pferdeblut	100	ml
Tween 80	1	ml
Aqua dest.	1000	ml
- Cycloserin-Cefoxitin-Agar		
Brain-Heart-Infusion-Agar (BHIA)	1	l
Cycloserin	250	mg / l
Cefoxitin	10	mg / l

Die Platten wurden jeweils zwei Tage bei Raumtemperatur vorreduziert.

- 5% Columbia-Blood-Agar
nicht vorreduziert

Erprobung:

Die Untersuchungen wurden an 266 Stuhlproben von Patienten, denen *C. difficile* nachgewiesen werden sollte, durchgeführt.

Zum Alkoholschock werden

0,5 ml homogenisierter Stuhl mit

0,5 ml tyndallisiertem 100 %igem Äthanol gemischt und 1h bei Raumtemperatur in anaerober Atmosphäre belassen.

Die BHIA-Platten wurden mit Äthanol-behandeltem, die CCA-Platten mit unbehandeltem Stuhl beimpft.

Die Platten wurden jeweils 2 Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Außerdem wurde untersucht, ob und inwieweit bei Nachweis von *C. difficile* auf aufwendige Laborgeräte verzichtet werden kann.

Die Platten mit Columbia-Blood-Agar wurden mit positiven Stühlen beimpft, die mit Äthanol vorbehandelt worden waren.

Anschließend wurden sie zwei Tage bei 37°C unter Benützung eines "gas-generating-kit" (Oxoid) bebrütet.

Zum Vergleich wurde CCA mit unbehandelten Stühlen beimpft.

Ergebnisse:

Auf CCA konnte *C. difficile* mit Alkoholschock in 94% der positiven Stuhlproben nachgewiesen werden, auf BHIA nur in 88%.

Mit CCA ließen sich ohne Alkoholschock Keimzahlen bis zu 100/g Stuhl nachweisen, dies wurde nach Alkoholschock nicht erreicht.

Auf dem CCA konnten bei gleicher Einsaat signifikant mehr Organismen nachgewiesen werden.

Mit dem CCA konnte *C. difficile* in allen positiven Stuhlproben nachgewiesen werden, während dies nach Alkoholschock und bei der Beimpfung von Columbia-Blood-Agar in aerober Atmosphäre nur bei 89% gelang.

Im Gegensatz zu CCA, bei dem keine Sporen nachweisbar sind, bleibt nach Alkoholschock die Zellmorphologie mit subterminaler Versporung von *C. difficile* erhalten.

Darüberhinaus können mit Alkoholschock auch andere Clostridienarten, wie *C. perfringens* und *C. tertium*, mitisoliert werden.

4.1.3.3 Untersuchung von LEVETT 1984 (69)

LEVETT testete die Wirkung von Alkohol auf die Nachweisrate von *C. difficile* und untersuchte zugleich, inwieweit ein Anreicherungsmedium die Nachweisgrenze erhöht.

Es wurden folgende Nährmedien verwendet:

- Cooked-Meat-Broth (CMB)

Dried meat granules (Lab M Lab 24)	37,5	g / l
Brain-heart-infusion (Lab M Lab 49)	17,5	g / l
Hefextrakt (Oxoid)	6,0	g / l
Hämin/Menadione-Lösung (Gibco)	10	ml / l

15 Min. bei 121°C autoklavieren

- modifizierter CCFA

Clostridium difficile Agar Base (Oxoid CM 601)	69	g / l
50% frische Eidotterlösung	36	ml / l
Cycloserin	250	mg / l
Cefoxitin	8	mg / l
2 %ige Neutralrotlösung	1,4	ml / l
p-Hydroxyphenylelessigsäure	1	g / l

Erprobung:

Die Untersuchung wurde an Stuhlproben von 143 Patienten durchgeführt, bei denen eine Clostridium difficile Infektion vermutet wurde.

Zum Alkoholschock wurde

0,5 ml homogenisierter Stuhl mit

0,5 ml tydallisiertem 100 %igem Äthanol gemischt

und 1 h bei Raumtemperatur in anaerober Atmosphäre belassen.

Die Stuhlproben wurden unbehandelt und nach Alkoholschock auf modifiziertem CCFA und auf 5% Pferdeblut-Agar ausgestrichen.

Die Platten wurden zwei Tage bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet.

Die Stuhlproben wurden außerdem direkt oder nach Behandlung mit Äthanol in CMB eingepflegt und nach fünf Tagen Inkubation bei 37°C in anaerober Atmosphäre auf Blutagar und modifiziertem CCFA subkultiviert.

Die Platten wurden zwei Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Ergebnisse:

Auf den festen Nährböden erhöht die Alkoholschockmethode die Nachweisrate um 50%, dagegen schnitt die Anreicherungs-methode ohne vorherige Äthanolbehandlung etwas besser ab.

Die Anreicherungs-methode erhöht die Nachweisrate bei den unbehandelten Stuhlproben auf das Doppelte, bei den mit Äthanol behandelten Stuhlproben nur um die Hälfte.

4.1.4 Nachweis von Stoffwechselprodukten

4.1.4.1 Gaschromatographischer Nachweis von p-Kresol auf modifiziertem CCFA nach PHILLIPS und ROGERS 1981 (94)

CCFA nach GEORGE (39) mit folgender Modifikation

Cycloserin	250	mg / l
Cefoxitin	8	mg / l
p-Hydroxyphenylessigsäure (filtersterilisiert)	0,1	%

Erprobung:

Stämme von *C. difficile*, von *C. scatologenes* und Stuhlproben wurden in die Studie einbezogen.

Die Proben wurden 48h in Peptonwasser inkubiert, dann auf modifiziertem CCFA ausgestrichen und anschließend ein bis zwei Tage bei 37°C in einer Atmosphäre von 90% H₂ und 10% CO₂ inkubiert.

Ergebnisse:

Alle Stämme von *C. difficile* produzierten schon nach 24h kleine, aber nachweisbare Mengen von p-Kresol, die dann nach 48h sehr deutlich wurden.

C. scatologenes, die einzige Clostridienart die neben *C. difficile* p-Kresol produziert, wächst auf modifiziertem CCFA nicht.

Aufgrund der reduzierten Antibiotikakonzentrationen, wurden die *C. difficile*-Kolonien bei der Verwendung von Stuhlproben häufig von anderen Darmkeimen überschwärmt.

Parakresol hat einen starken, schon mit der Nase wahrnehmbaren Geruch, so daß dessen gaschromatographischer Nachweis oft nur als Bestätigung diene.

4.1.4.2 Gaschromatographischer Nachweis von Capronsäure und p-Kresol nach Kultur in Norleucin-Tyrosin-Broth nach NUNEZ-MONTIEL et al 1983 (90)

Norleucin-Tyrosin-Broth (NT-Broth)

Trypticase (BBL)	5	g
Hefeextrakt (Difco)	5	g
NaCl	2,5	g
Natriumsulfit	0,1	g
Virginia Polytechnic Institute and State University Salzlösung	40	ml
Aqua dest.	960	ml

pH 7,6

15 Min. bei 121°C autoklavieren, dann Zugabe von

L-Norleucin	5	g
L-Tyrosin	2	g

Erprobung:

Das Verfahren wurde an Stämmen von *C. difficile* erprobt. Die Capronsäure und das p-Kresol wurden nach Inkubation bei 35°C über 24-48h in einer Atmosphäre von 10% H₂, 5% CO₂ und 85% N₂ mittels Gaschromatographie nachgewiesen.

Ergebnisse:

Die NT-Broth wird als sehr selektiv bezeichnet, da keine der folgenden anderen Clostridienarten, wie *C. bifermentans*, *C. butyricum*, *C. cadaveris*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. scatologenes*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. sphenoides*, *C. sporogenes*, *C. subterminale*, *C. tertium*, *C. tetani* und *C. scatologenes* in diesem Medium zugleich beide Stoffwechselprodukte produzieren.

4.1.4.3 Gaschromatographischer Nachweis von Isocapronsäure nach Kultivierung in Cooked-Meat-Carbohydrate-Selektiv-Broth nach BUCHANAN 1984 (22)

Cooked-Meat-Carbohydrate-Selektiv-Broth (CMS)

Cooked meat base (Difco)

Glukose	3	g / l
Cellobiose	1	g / l
Maltose	1	g / l
lösliche Stärke	1	g / l

Nach dem Autoklavieren (keine näheren Angaben) abkühlen lassen und Zugabe von

Cycloserin	500	mg / l
Cefoxitin	16	mg / l

Das Medium ist, bei 4°C aufbewahrt, 2 Wochen gebrauchsfähig.

Erprobung:

Das Verfahren wurde an Stuhlproben erprobt.

Die Proben wurden ein bis zwei Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre inkubiert.

Es wurde Isocapronsäure (peaks ≥ 2 mm) mittels Gaschromatographie nachgewiesen.

Die ermittelten Ergebnisse wurden mit den Untersuchungsergebnissen auf CCFA nach GEORGE (39) verglichen.

Ergebnisse:

Das flüssige Anreicherungsmedium erhöht die Nachweisrate, verglichen mit den Ergebnissen auf CCFA nach GEORGE (39) um über 100%.

100 KBE/ml Stuhlsuspension lieferten erkennbare Isocaprionsäuremengen nach 24-48h Inkubationszeit.

Es wurden keine falsch positiven Ergebnisse auf CMS ermittelt.

4.1.4.4 Gaschromatographischer Nachweis von Isocaprionsäure nach Kultivierung in Gentamycin-Cycloserin-Cefoxitin-Broth nach CARROLL et al 1983 (24)

Gentamycin-Cycloserin-Cefoxitin-Broth (GCC)

Brain-Heart-Infusion-Broth (präreduziert)	4,5	ml / l
Gentamycin	5	mg / l
Cycloserin	250	mg / l
Cefoxitin	8	mg / l

Erprobung:

Das Verfahren wurde an Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe erprobt und mit dem modifizierten CCFA nach GEORGE (39) verglichen. Die Modifikation bestand in der Reduktion der Antibiotika auf

Cycloserin	250	mg / l
Cefoxitin	8	mg / l

Die Proben wurden jeweils über zwei Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Ergebnisse:

Die Nachweisrate bei Verwendung von GCC steigt, verglichen mit den Ergebnissen auf modifiziertem CCFA nach GEORGE (39), um ca. 30%.

4.2 Nachweis von Sporen des Clostridium difficile

4.2.1 Untersuchung von WILSON et al 1982 (134)

WILSON et al entwickelten ein Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Medium und untersuchten im Vergleich mit CCFA nach GEORGE (39) dessen Einfluß auf die Nachweisrate von vegetativen Keimen und Sporen von *C. difficile*.

Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA)

Herstellung wie CCFA nach GEORGE (39) aber anstelle von Eidotter wird vor dem Autoklavieren 0,1% Natriumtaurocholat zugegeben.

Erprobung:

Die Methode wurde an Stämmen von *C. difficile*, an Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe und an Stuhl, in den künstlich 160 KBE/ml vegetative Formen und 75 KBE/ml Sporen von *C. difficile* eingesät worden waren, erprobt und mit den Ergebnissen auf CCFA nach GEORGE (39) und mit CCFA ohne Eigelb verglichen.

Die Sporensuspension wurde mit Hilfe des folgenden Sporulationsmediums gewonnen.

Trypticase peptone (BBL)	90	g
Proteose peptone No 3 (Difco)	5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	g
Tris-Puffer	1,5	g
Aqua dest.	1000	ml
pH 7,4		

20 Min. bei 121°C autoklavieren und vor Gebrauch 24h präreduzieren

Nach Beimpfung wurde das Medium 48h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet.

Um die vegetativen Clostridien abzutöten, wurde das Sporulationsmedium im Wasserbad 10 Min. auf 56°C erhitzt, dann auf Eis gestellt und in anaerober Atmosphäre belassen.

Die Sporenanzahl betrug 10^7 /ml.

Ergebnisse:

Mit Hilfe des TCCFA wurden um $1,7 \log_{10}$ mehr Sporen als auf CCFA und um $3,5 \log_{10}$ mehr Sporen als auf CCFA ohne Eigelb nachgewiesen.

Beim Nachweis der vegetativen Form von *C. difficile* fanden sich identische Ergebnisse auf allen drei Medien.

Bei Stuhlproben von Patienten waren TCCFA und CCFA gleich sensitiv. Auf dem TCCFA waren die Ergebnisse besser, wenn die Stühle vor der Untersuchung länger gelagert, damit länger dem Luftsauerstoff ausgesetzt waren und somit Versporung zu erwarten war. Die Fluoreszenz ist auf TCCFA deutlicher zu erkennen als auf CCFA. Der TCCFA ist leichter herzustellen als CCFA.

4.2.2 Untersuchung von WILSON 1983 (135)

WILSON testete folgende Medien im Hinblick auf Sporenkeimung, Sporennachweis und Nachweis der vegetativen Form von *C. difficile*.

- Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA)
Herstellung wie CCFA nach GEORGE (39) aber anstelle von Eigelb wird $1,9 \times 10^{-3}$ M ($\cong 0,1\%$) Taurocholat unterschiedlichen Reinheitsgrades verwendet.
- Natriumcholat-Medium
Herstellung wie CCFA nach GEORGE (39) aber anstelle von Eigelb wird Natriumcholat in folgenden Konzentrationen verwendet:
 $1,2 \times 10^{-3}$ M ($\cong 0,05\%$)
 $2,4 \times 10^{-3}$ M
 $1,2 \times 10^{-2}$ M ($\cong 0,5\%$)
- Natriumdesoxycholat-Medium
Herstellung wie CCFA nach GEORGE (39) aber statt Eigelb wird $1,9 \times 10^{-3}$ M Natriumdesoxycholat verwendet.

Erprobung:

Die genannten Medien wurden an Stämmen von *C. difficile* erprobt und im Hinblick auf Sporenkeimung, Sporennachweis und Nachweis vegetativer Organismen verglichen.

Die Sporensuspension wurde wie beschrieben (134) hergestellt. Die Sporensuspension wurde jeweils 0,9 ml CCFA Broth ($\cong$ CCFA nach GEORGE (39) , aber ohne Agar und Neutralrot) und 0,1 ml der verschiedenen Cholatmedien zugegeben.

Außerdem wurden 6,0 mg/l Rifampicin zugesetzt, um das Überwachsen der keimenden Sporen zu verhindern.

Die Medien wurden 16h bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Ergebnisse:

$1,9 \times 10^{-3}$ M Natriumtaurocholat und äquimolares Natriumdesoxycholat induzieren die Sporenkeimung zu 90% bzw. zu 82%.

Natriumcholat induziert die Sporenkeimung sowohl in niedriger, als auch in hoher Konzentration.

Natriumcholat in hoher Konzentration, $1,2 \times 10^{-2}$ M Natriumdesoxycholat und unreines Natriumtaurocholat erhöhen die Sporennachweisrate nicht oder nicht nennenswert.

Natriumdesoxycholat bewirkt eine absolute Unterdrückung vegetativer Organismen, Natriumcholat in hoher Konzentration ($1,2 \times 10^{-2}$ M) senkt die Nachweisrate um den Faktor 10^5 , Natriumcholat in den niedrigen Konzentrationen ($1,2 \times 10^{-3}$ M und $2,4 \times 10^{-3}$ M) und reines Natriumtaurocholat beeinflussen das Wachstum vegetativer Keime nicht negativ.

4.2.3 Untersuchung von BUGGY et al 1983 (23)

BUGGY et al verglichen Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar mit Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon und CCFA nach GEORGE (39) im Hinblick auf Sporennachweis und Nachweis der vegetativen Form von *C. difficile*.

Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA)

Herstellung wie CCFA nach GEORGE (39) anstelle von Eigelb wird jedoch 0,1% Natriumtaurocholat (Mann Research Laboratories) zugegeben.

Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (TCCFB)

Herstellung wie TCCFA aber ohne Agar.

Erprobung:

Die Medien wurden an Stämmen von *C. difficile* und deren Sporen erprobt.

Die Sporensuspension wurde mit Sporulationsmedium (134) und nachfolgendem Hitzeschock (134) hergestellt und dann bei -20°C eingefroren.

Alle Medien wurden mit und ohne vorheriges Präreduzieren bis zu 18h untersucht und innerhalb von drei Tagen nach der Herstellung verbraucht.

Nach der Beimpfung wurden die Medien zwei Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Ergebnisse:

Beim Vergleich zwischen präreduzierten und nicht-präreduzierten Medien wurde der Nachweis von vegetativen Keimen durch das Präreduzieren von 1/2 - 2h sowohl auf CCFA als auch auf TCCFA erhöht. Längere Vorreduktionszeiten bringen keinen Vorteil.

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen CCFA und TCCFA beim Nachweis vegetativer Organismen.

Auf TCCFA waren 100 mal mehr Sporen nachweisbar als auf CCFA und dies sowohl auf präreduzierten als auch auf nicht-präreduzierten Medien.

Die Vorreduktion bringt beim Sporennachweis keine Vorteile.

Mit TCCFA konnten bei gleicher Keimeinsaat bis zu 25 mal mehr Sporen nachgewiesen werden als mit CCFA.

TCCFB erhöht die Nachweisrate nur geringfügig.

5.0 Aufgabe der Untersuchung

In der vorliegenden Studie sollte in erster Linie untersucht werden, in welchem Maße *Clostridium difficile* in verschiedenen Altersgruppen der gesunden Bevölkerung als Bestandteil der normalen Darmflora vorkommt.

Im Vergleich dazu wurde eine kleine Gruppe von Personen untersucht, bei der eine höhere Inzidenz von *C. difficile* zu erwarten war.

Die Untersuchungen wurden mit einem flüssigen Anreicherungsmedium, der Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB) und der konventionellen Züchtung auf Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) durchgeführt.

Mit speziellen Vorversuchen war deshalb auch die Frage zu klären, wie empfindlich diese Nachweismethoden sind und bis zu welchem Grade die CCFB mit Untersuchungsmaterial belastet werden kann, ohne die Ergebnisse ungünstig zu beeinflussen.

In einem Nebenversuch wurde außerdem ermittelt, wie lange *C. difficile* in Stuhlproben bei verschiedenen Lagerungstemperaturen anzüchtbar bleibt.

6.0 Material und Methoden

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden folgende Medien verwendet:

- Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) (Oxoid CM 601),
- Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB),
- Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA),
- Peptone-Yeast-Glucose (PYG),
- Phosphatpuffer (PB) und
- verschiedene Zuckerlösungen.

6.1 Rezepte der verwendeten Medien

6.1.1 Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) (Oxoid CM 601)

C. difficile Agar Base (Oxoid CM 601)	69	g
Aqua dest.	1000	ml
1%-ige alkoholische Neutralrotlösung	3	ml

15 Min bei 121°C autoklavieren, nach Abkühlung

Zugabe von

Cycloserin (Serva Feinbiochemica Heidelberg, New York)	500	mg
Cefoxitin (Mefoxitin, MSD, München)	16	mg
Eidotter-NaCl-Gemisch 1:1	50	ml

Abfüllen in Mengen von je 15 ml in Petrischalen,
bis zum Gebrauch Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

6.1.2 Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB)

Proteose Pepton No. 2 (Difco)	40	g
Na ₂ HPO ₄	5	g
KH ₂ PO ₄	1	g
NaCl	2	g
MgSO ₄ (wasserfrei)	0,1	g
Fruktose	6	g
1%-ige alkoholische Neutralrotlösung	3	ml
Aqua dest.	1000	ml

15 Min bei 121°C autoklavieren, nach Abkühlung auf
50°C, Zugabe von

Cycloserin (Serva Feinbiochemica Heidelberg, New York)	500	mg
Cefoxitin (Mefoxitin, MSD, München)	16	mg
Eidotter-NaCl-Gemisch 1:1	50	ml

Abfüllen von 10-50 ml in sterilisierte Glas- bzw.
Plastikflaschen (100 ml), die fest verschlossen
bis zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurden.

6.1.3 Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (TCCFA)

Herstellung wie 6.1.1, nur wird dem Basismedium CCFA vor dem Autoklavieren 1 g Taurocholat zugegeben.

Das Medium wird ebenfalls in Mengen von je 15 ml in Petrischalen abgefüllt und bis zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

6.1.4 Peptone-Yeast-Glucose (PYG)

Pepton (Oxoid L34)	10	g
Hefeextrakt (Oxoid L 21)	10	g
Cystein-HCl	0,5	g
Aqua dest.	1000	ml
Glukose	10	g
Salzlösung	40	ml
Vit-K-Hämin-Lösung	10	ml

15 Min bei 121°C autoklavieren, dann jeweils 3 ml der Lösung in Glasröhrchen mit Schraubverschluß abfüllen und bis zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank lagern.

Salzlösung

CaCl ₂	0,2	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2	g

werden in 800 ml Aqua dest. gelöst, dann Zugabe von

K ₂ HPO ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
NaHCO ₃	10	g
NaCl	2	g
H ₂ O	200	ml

Die Lösung wird zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Vit-K-Hämin-Lösung

50 mg Hämin werden in 1 ml 1n NaOH gelöst, mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und dann bei 121°C über 15 Min autoklaviert.

Ebenso werden 100 mg Vit K in 20 ml 95%-igem Äthanol gelöst und anschließend durch Filtration sterilisiert.

Die Vit-K-Hämin-Lösung wird hergestellt, indem

1 ml der Vit-K-Lösung mit
1000 ml Häminlösung gemischt wird.

6.1.5 Phosphatpuffer (PB)

KH_2PO_4	4,5	g
Na_2HPO_4	6,0	g
Cysteinhydrochlorid	0,5	g
Tween 80	1,0	g
Aqua dest.	1000	ml
pH 7,4		

15 Min bei 121°C autoklavieren und bei 4°C im Kühlschrank lagern.

6.1.6 Zuckerlösungen (Phenolrot broth base)

Proteose Pepton No. 3	10	g
Lab Lemco Pulver	1	g
NaCl	5	g
Aqua dest.	1000	ml
pH 7,8		

15 Min bei 121°C autoklavieren und abkühlen lassen.

Danach Zugabe einer Flasche (10 ml) Isovitalex (BBL) die vorher in sterilem Aqua dest. gelöst wurde.

Anschließend wird der pH auf 8,5 eingestellt (3ml 10%-ige NaOH/l).

1% Zucker (Mannose, Mannit, Raffinose) in etwas Wasser lösen und sterilfiltriert zugeben.

Die Lösung wird zu je 3 ml in kleine Schraubröhrchen abgefüllt.

6.2 Geräte zur Inkubation und Identifikation der Kulturen von C. difficile

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Anaerobenkammer Anaerobic System Modell 1024 (Forma Scientific)
- Gas-Pak-System (BBL)
mit Palladiumkatalysator
- Gaschromatograph (Varian Modell 3700)
mit Flammenionisationsdetektor

Die weiteren Geräte werden bei den Beschreibungen der einzelnen Versuche erwähnt.

6.3 Bestimmung der Belastbarkeit der CCF-Bouillon

Der Versuch wurde zur Prüfung der Aufnahmefähigkeit der CCFB durchgeführt. Es sollte festgestellt werden, ob und in welchem Grade die Ergebnisse von der Menge des verwendeten Untersuchungsmaterials beeinflusst werden.

6.3.1 Material

Es wurden jeweils 50 ml der CCFB in sterile Glasflaschen (100 ml) mit Plastiksraubverschluß abgefüllt.

Die Flaschen wurden fest verschlossen und bis zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Von 18 stationären Patienten des Klinikums Großhadern der Universität München, bei denen *C. difficile* im Stuhl nachgewiesen worden war, wurden Stuhlproben von jeweils mehr als 15 g gesammelt. Die Proben wurden innerhalb von 24 Std. für den Versuch verwendet.

6.3.2 Untersuchungsmethode

Mengen von 1,2,3,4 und 5g der Stuhlproben wurden in normaler aerober Atmosphäre gewogen und in die Flaschen mit 50 ml prä-reduzierter und auf Zimmertemperatur erwärmer CCFB eingefüllt. Die Flaschen wurden in die Anaerobenkammer eingeschleust und mit einem Schüttler (Whirl-Mix) gut durchmischt.

Nach zweitägiger Bebrütung bei 37°C in dem in die Anaerobenkammer integrierten Brutschrank wurde die Kultur kurz aufgeschüttelt und jeweils eine Platinöse (ca. 10 µl) auf prä-reduzierte CCFA-Platten ausgestrichen.

Diese Platten wurden anschließend in der Kammer in Gas-Pak-Gefäße gebracht, 30 Min. im offenen Gefäß in der anaeroben Atmosphäre stehen gelassen, dann dicht verschlossen, ausgeschleust und zwei Tage bei 37°C in einem externen Brutschrank inkubiert.

Das Wachstum von *C. difficile* wurde in diesem Versuch anhand der charakteristischen Kolonieform und -farbe und am typischen kresolartigen Geruch bestimmt.

6.4 Bestimmung der Empfindlichkeit des Nachweises von C. difficile

Die Untersuchung diente zur Ermittlung der Empfindlichkeit der verwendeten Nachweismethoden.

Dabei sollte einerseits bestimmt werden, welche Keimzahlen von C. difficile zum Nachweis notwendig sind und andererseits ermittelt werden, ob und inwieweit die Anreicherung in CCFB Vorteile gegenüber der konventionellen Nachweismethode von C. difficile auf CCFA bringt.

6.4.1 Material

Es wurden 7 verschiedene, tiefgefrorene Stuhlproben mit C. difficile, die im diagnostischen Labor gesammelt und bei -20°C gefroren aufbewahrt worden waren, verwendet.

Die Stuhlproben wurden aufgetaut und jeweils mit PB bei Zimmertemperatur in aerober Atmosphäre homogenisiert.

Diese Mischungen wurden als Ausgangssuspensionen für die nachfolgenden Versuche gebraucht.

6.4.2 Methoden

6.4.2.1 Quantitative Prüfung

Die Ausgangssuspensionen wurden in 5 Zehnerschritten bis $1:10^{-5}$ mit temperiertem und präreduziertem PB verdünnt.

Die erste Verdünnungsstufe wurde jeweils in aerober Umgebung, die folgenden dann in der Anaerobenkammer hergestellt.

Das Volumen betrug immer 2 ml.

Nachdem die Suspensionen jeder Verdünnungsstufe 1 Minute gut durchmischt worden waren (LKB Ultralab-System Multimixer 2077), wurden jeweils 50 µl mit einer Eppendorf-Pipette auf je drei CCFA-Platten pipettiert und mit einem sterilen Metallspatel, der bei jeder neuen Verdünnungsstufe gewechselt wurde, über die gesamte Plattenfläche verteilt.

Die CCFA-Platten wurden wie unter 6.3.2 beschrieben, behandelt.

Aus der Koloniezahl der drei Einzelplatten jeder Verdünnungsstufe wurde der Mittelwert bestimmt und auf Kolonie-bildende Einheiten (KBE) pro ml Stuhlsuspension umgerechnet.

Die Keimzahlen für die Ausgangssuspension wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der verwendeten Menge berechnet.

6.4.2.2 Qualitative Prüfung

Parallel zur Koloniezählung wurde die Nachweisgrenze von *C. difficile* auf CCFA und CCFB qualitativ geprüft.

Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) (Oxoid CM 601)

In der Anaerobenkammer wurde mit Hilfe einer Einwegplastiköse (10 µl) aus jeder Verdünnungsstufe der oben beschriebenen Suspensionen eine Kultur auf CCFA angelegt.

Die Platten wurden behandelt wie unter 6.3.2 beschrieben.

Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB)

Zu 10 ml präreduzierter und auf Zimmertemperatur vorgewärmter CCFB in sterilisierten Plastikflaschen (100 ml) mit Schraubverschluß wurden in der Anaerobenkammer 1 ml Stuhlsuspension aus jeder Verdünnungsstufe pipettiert und dann 1 Minute lang mit einem Schüttler gut durchmischt.

Nach zweitägiger Inkubation in anaerober Umgebung bei 37°C im Brutschrank der Anaerobenkammer wurde nach gründlichem Schütteln der Kultur mit Hilfe einer Platinöse auf präreduzierte und ange-wärmte CCFA-Platten ausgestrichen.

Die Platten wurden wie unter 6.3.2 beschrieben, behandelt.

Das Wachstum von *C. difficile* wurde auch in diesem Versuch nur anhand der Koloniemorphologie, der -farbe und des typischen Geruchs bestimmt.

6.5 Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *C. difficile* in Stuhlproben

6.5.1 Material

Acht von Patienten stammende Stuhlproben die *C. difficile* enthielten, wurden bis zur Untersuchung bei -20°C gefroren aufbewahrt. Die Proben wurden aufgetaut und mit PB in aerober Atmosphäre suspendiert.

Danach wurden die Suspensionen jeweils auf drei konventionelle Probenröhrchen aus Kunststoff (63 x 22mm) verteilt, so daß jedes Probenröhrchen mit jeweils der gleichen Menge (rund 6 g) gefüllt war.

6.5.2 Methoden

Je eines dieser Röhrchen wurde bei Zimmertemperatur (ca. 20°C), bei 4°C im Kühlschrank und bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Über drei Wochen, wurden alle zwei Tage jeweils 0,5 g Stuhl aus den einzelnen Röhrchen entnommen und in 5 ml präreduzierte CCFB in Reagenzgläsern, eingepflegt.

Die Kulturen wurden in die Anaerobenkammer eingeschleust und zwei Tage im Brutschrank des Systems bei 37°C bebrütet.

Zum Nachweis von *C. difficile* wurden mit der Platinöse Subkulturen auf CCFA angelegt.

Die Platten wurden wie unter 6.3.2 beschrieben, behandelt.

Die Identifizierung erfolgte anhand der Koloniemorphologie, der Koloniefarbe und des typischen Geruchs.

6.6 Verbreitung von *C. difficile* in verschiedenen Altersklassen der gesunden Bevölkerung

6.6.1 Material

Die untersuchte Population umfaßte nur Personen, die nicht stationär behandelt wurden, nicht an Diarrhoe erkrankt waren und keine Antibiotika erhielten.

Pflege- und Laborpersonal wurde nicht in diesen Teil der Studie einbezogen.

Darüberhinaus wurden, nach Möglichkeit auch Personen ausgeschlossen, die ständig im gleichen epidemiologischen Umfeld lebten, wie beispielsweise Soldaten und Kinder aus Kinderheimen.

Zwar wurden Bewohner von Wohnstiften und dergleichen untersucht, nicht aber von Alters- und Pflegeheimen mit klinischer Pflege.

Die Herkunft der Stuhlproben und die dazugehörigen demographischen Daten sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

Vorbereitung des Versuchs

Die Teilnehmer an der Studie wurden in einem Brief über den Sinn dieser Untersuchung und die Formalitäten informiert.

In diesem Schreiben wurde auch der technische Ablauf beschrieben:

Eine größere Menge Stuhl (ca. 5g) sollte in Proberöhrchen aus Kunststoff (63 x 22 mm) mit am Deckel befestigtem Löffel gefüllt werden.

Darüberhinaus sollte auf vorbereiteten Klebeetiketten, das Lebensalter, das Geschlecht, die Nationalität und das Datum der Stuhlprobe angegeben werden. Die gefüllten Proberöhrchen sollten dann in Versandtaschen gesteckt werden und bis zur Abholung in einem kühlen Raum gelagert werden.

Die Stuhlproben aus der Gruppe der Erwachsenen im Alter von 20-30 Jahren und von 40-60 Jahren, stammten von Personen, die in der Lebensmittelbranche tätig waren und deren Stühle alljährlich im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern auf pathogene Darmkeime hin untersucht werden mußten. Die Proben wurden dort nach dem Anlegen der Kulturen abgeholt. Die für diesen Versuch verwendeten Stuhlproben waren nie älter als drei Tage.

Tabelle 11 : Herkunft der Stuhlproben demographische Daten

Altersgruppe	Gesamtzahl	n	Ausländeranteil (%)	Herkunft	Bemerkungen
Neugeborene bis 3 Tage	weiblich männlich	57 34 23	9 (15,7)	Neugeborenenstation im Städtischen Krankenhaus München Schwabing	
Kinder 2 Monate - 2 Jahre	weiblich männlich	147 67 80	65 (44,2)	Kinder aus 8 verschiedenen Kindertagesstätten in München	höchstens 26 Kinder aus der gleichen Tagesstätte
Kinder 5-13 Jahre	weiblich männlich	204 110 94	20 (9,8)	Kinder aus mehreren Schu- len in München und Frei- sing und aus 2 Münchner Tagesstätten	höchstens 42 Kinder aus der gleichen Tagesstätten
Erwachsene 20-30 Jahre	weiblich männlich	200 112 88	Nationalität nicht zu ermitteln	Personen aus dem Lebens- mittelgewerbe, deren Stüh- le jährlich im landesun- tersuchungsamt für das Ge- sundheitswesen Südbayern auf Erreger der TPER-Gruppe untersucht wurden.	
Erwachsene 40-60 Jahre	weiblich männlich	200 125 75	Nationalität nicht zu ermitteln		
Erwachsene über 60 Jahre (bis 93 Jahre)	weiblich männlich	201 168 33	Nationalität nicht angegeben	Bewohner aus 8 verschie- denen Senioren-Wohnheimen in München	höchstens 39 Personen aus dem gleichen Wohnheim

6.6.2 Methoden

6.6.2.1 Nachweis von C. difficile

Zum Nachweis von C. difficile wurden CCFA, TCCFA und CCFB verwendet.

CCFA und TCCFA

Jede Stuhlprobe wurde in aerober Umgebung mittels einer Platinöse auf ein Viertel einer präreduzierten und auf Raumtemperatur angewärmten CCFA- und TCCFA-Platte ausgestrichen.

Die Platten wurden sofort in die Anaerobenkammer eingeschleust und behandelt wie unter 6.3.2 bereits beschrieben.

CCFB

Außerdem wurde eine möglichst große Menge der Stuhlprobe (in der Regel 1g) eingewogen und im Verhältnis 1:10 mit präreduzierter und auf Zimmertemperatur angewärmter CCFB in sterilen Plastikflaschen suspendiert.

Die Proben wurden dann in die Anaerobenkammer eingeschleust und mit einem Schüttler (Whirl-Mix) gut durchmischt.

Das weitere Vorgehen entspricht dem unter 6.3.2 bereits beschriebenen Verfahren.

6.6.2.2 Bestimmung von C. difficile

C. difficile wurde anhand der charakteristischen Kolonie- und Zellmorphologie nach Gramfärbung, biochemisch anhand der Spaltung bestimmter Zuckerarten und gaschromatographisch durch den Nachweis typischer Fettsäuremuster identifiziert.

Gramfärbung und Zellmorphologie

C. difficile ist ein grampositives, schlankes Stäbchen mit subterminaler Versporung, die in frischen Kulturen nur selten zu sehen ist.

Koloniemorphologie

C. difficile wächst auf CCFA und TCCFA in flachen, schleimigen, transparent erscheinenden, unregelmäßig geformten Kolonien, die durch Fruktosespaltung und dem damit verbundenen Indikatorumschlag gelb gefärbt sind.

Biochemische Differenzierung

Clostridium difficile-verdächtige Kolonien wurden mit der Platinöse in 5 ml vorgewärmte und präreduzierte Nährlösungen mit Mannose, Raffinose und Mannit, denen Phenolrot als Indikator zugesetzt war, eingimpft.

Die Lösungen wurden dann 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank der Anaerobenkammer bebrütet.

C. difficile zeigt folgendes Reaktionsmuster:

Mannose und Mannit positiv und Raffinose negativ.

Gaschromatographie

Clostridium difficile-verdächtige Kolonien wurden mit Hilfe einer Platinöse in eine vorgewärmte und präreduzierte Peptone-Yeast-Glukose-Lösung inokuliert und zwei Tage bei 37°C in anaerober Atmosphäre bebrütet.

Zur Extraktion der Fettsäuren wurden zu

1 ml PYG-Lösung

0,2 ml 50%-ige Schwefelsäure und

1 ml Diäthyläther zugegeben.

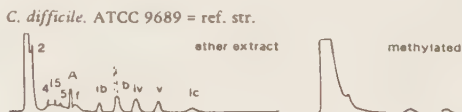
Die Mischung wurde eine Minute lang kräftig geschüttelt.

Aus der sich nach dem Ausschütteln absetzenden Ätherphase wurde mittels einer Mikroliterspritze 1 µl entnommen und in den Gaschromatographen injiziert.

Der Gaschromatograph war mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet, Stickstoff diente als Trägergas.

C. difficile wird am charakteristischen Fettsäuremuster von Essigsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure, Valeriansäure und Isocaproensäure identifiziert.

Abbildung 1: Fettsäuremuster von *C. difficile* (GC)



Aus: Anaerobe Laboratory Manual
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blacksburg, Virginia 24061 (1975)

Geruch

Kulturen von *C. difficile* haben außerdem einen recht charakteristischen, süßlich-modrigen und kresolartigen Geruch, der von der Bildung von p-Kresol herrührt.

6.7 Verbreitung von C. difficile unter den Mitarbeitern eines bakteriologischen Labors

6.7.1 Material

Diese Gruppe bestand aus dem Personal der Außenstelle für Medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts am Klinikum Großhadern.

An der Untersuchung beteiligten sich 27 Personen im Alter von 20 bis 50 Jahren; 3 waren männlich und 24 weiblich.

Die Beteiligten wurden gebeten, konventionelle Stuhlröhrchen aus Plastik (63 x 22 mm) zur Hälfte mit Stuhl zu füllen (ca. 5g) und den Namen und das Datum der Stuhlprobe anzugeben. Die Proben wurden im Stuhllabor abgegeben und nach Erhalt sofort auf C. difficile hin untersucht.

Die Stuhlproben waren höchstens 24 Stunden alt.

6.7.2 Methoden

Die Proben wurden auf CCFA und CCFB verarbeitet; auf TCCFA wurde bei dieser Untersuchung verzichtet.

Im übrigen wurde verfahren wie unter 6.6.2. beschrieben.

6.8 Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen zu den Unterschieden in der Häufigkeit von C. difficile in den einzelnen Bevölkerungsgruppen und über die Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Nachweismethoden wurden mit der Vierfeldertafel und mit dem modifizierten Vorzeichentest nach McNemer durchgeführt.

7.0 Ergebnisse

7.1 Begleitende Versuche zur Methodik

7.1.1 Bestimmung der Belastbarkeit der CCF-Bouillon

In diesem Versuch sollte festgestellt werden, ob die selektive Fähigkeit der CCFB mit wachsendem Inokulum beeinträchtigt wird. Das maximale Inokulum sollte für die Untersuchung der Häufigkeit von *C. difficile* in der gesunden Bevölkerung verwendet werden, um auf diese Weise auch sehr geringe Keimzahlen nachweisen zu können.

Der Versuch wurde qualitativ ausgewertet.

C. difficile konnte in allen Stuhlproben, die sich endgültig als positiv erwiesen, unabhängig von der Größe des Inokulums regelmäßig nachgewiesen werden.

Für die folgende Untersuchung über die Verbreitung von *C. difficile* wurde die CCFB deshalb im Verhältnis 1:10 mit Stuhl beimpft.

Eine höhere Inokulumdichte als 1:10 wurde nicht geprüft.

7.1.2 Der Einfluß der eingeimpften Stuhlmenge auf den Nachweis von *C. difficile*

Um die Nachweisrate für *C. difficile* zu erhöhen, sollten möglichst große Probenmengen mit Hilfe der Anreicherung in CCFB untersucht werden. Die angestrebte Stuhlmenge von 5g je Probe wurde aber nur selten abgegeben.

Die Verteilung und die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Ergebnisse erlauben leider keine zuverlässige Aussage über den Einfluß der Größe der verarbeiteten Proben, doch scheint dieser Einfluß nicht wesentlich zu sein, da ca. 50% der Nachweisrate von *C. difficile* bei Einwaagen von weniger als 1g gefunden wurden.

Tabelle 12: Einfluß der verarbeiteten Stuhlmenge auf den Nachweis von *C. difficile*

Probenmenge	n	Nachweis von <i>C. difficile</i>	%
< 1g	397	29	7,3
1 - 2g	381	17	4,5
> 2g	231	11	4,8
insgesamt	1009	57	5,6

7.1.3 Empfindlichkeit der Nachweismethoden

Die Ergebnisse der Bestimmung der Empfindlichkeit der Nachweismethoden mit CCFA und CCFB sind in Tabelle 13 dargestellt.

In dieser Tabelle ist jeweils in der ersten Spalte die für die Ausgangssuspension ermittelte Clostridienzahl angegeben, sie reicht von 380 bis $1,7 \times 10^7$. Die folgenden Spalten zeigen den durch wiederholte Verdünnung im Verhältnis 1:10 rechnerisch zu erwartenden Clostridiengehalt der Verdünnungsstufen.

Der erfolgreiche Nachweis von *C. difficile* mit den beiden Methoden ist jeweils durch ein "+" gekennzeichnet.

Die Kultur auf CCFA erweist sich als die weniger empfindliche der beiden Methoden; die niedrigste erfaßte Clostridienmenge beträgt $1,7 \times 10^3$. Dagegen sind mittels Anreicherung über CCFB und nachfolgende Subkultur auf CCFA noch 80 bis 40 Clostridien nachweisbar; in sechs von sieben geprüften Suspensionen liegt die Nachweisgrenze unter 10^3 Clostridien.

7.1.4 Überlebensdauer von *C. difficile* bei verschiedenen Umgebungstemperaturen

Die Überlebensfähigkeit von *C. difficile* bei Umgebungstemperaturen von 37°C, 20°C und 4°C wurde an acht Stuhlproben untersucht, die *C. difficile* enthielten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Die Bakterien blieben in allen Proben bei verschiedenen Temperaturen zwei Wochen lang vermehrungsfähig. Nach der dritten Woche waren die Erreger teilweise abgestorben, in drei der acht Proben, bei 20°C, in vier bei 37°C und in sechs bei 4°C.

Tabelle 13: Empfindlichkeit der Nachweismethoden

Ermittelte KBE/ml Stuhlsuspension	unverdünn	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
CCFA	380	38	3			
CCFB*	-	-	-			
	+	+	-			
CCFA	500	50	5			
CCFB*	-	-	-			
	+	+	-			
CCFA	740	74	7			
CCFB*	-	-	-			
	+	+	-			
CCFA	800	80	8			
CCFB*	-	-	-			
	+	+	-			
CCFA	5,9 x 10 ⁴	5,9 x 10 ³	5,9 x 10 ²	59	5	
CCFB*	+	+	-	-	-	
	+	+	+	+	+	
CCFA	3,7 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁴	3,7 x 10 ³	3,7 x 10 ²	37
CCFB*	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	+
CCFA	1,7 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1,7 x 10 ²
CCFB*	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+

* mit Subkultur auf CCFA

Tabelle 14: Überlebensdauer von *C. difficile* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen

[illegible]

7.2 Häufigkeit des Vorkommens von C. difficile in der gesunden Bevölkerung

7.2.1 Kinder

Alle Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 15 dargestellt. Von 57 Neugeborenen war nur ein Mädchen (1.8%) Träger von C. difficile.

Unter 68 Kleinkindern im Alter von 2-12 Monaten waren 33 Träger (48,5%), bei 79 Kindern im Alter von ein bis zwei Jahren waren es 9 (11,4%) und bei 204 Kindern über fünf Jahren (bis 13 Jahre) waren es 8 (3,9%).

In der Gruppe der Kinder konnte im Gegensatz zu den Erwachsenen die Zahl der Ausländer bestimmt werden. Ihr Anteil lag in der ersten Altersstufe (2-12 Monate) bei 41,2%, in der zweiten Gruppe (ein bis zwei Jahre) bei 46,8% und bei den älteren Kindern (über 5 bis 13 Jahre) bei 9,8%.

7.2.2 Erwachsene

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 16 dargestellt.

Die Trägerrate unter den Erwachsenen war niedrig; unter 601 Personen fanden sich nur 6 mit Nachweis von C. difficile.

Die Schichtung in Altersgruppen von annähernd gleichem Umfang ergab eine Trägerrate von 1,5% für Erwachsene zwischen 20 und 30 Jahren, eine von 0,5% für die zwischen 40 und 60 Jahren und eine von 0,9% für die über 60 Jahren.

Der Anteil von Ausländern war bei den Erwachsenen nicht bekannt.

7.2.3 Häufigkeit von C. difficile in Abhängigkeit von Geschlecht und Herkunft (Ausländer)

Statistische Berechnungen zum Vergleich der Trägerraten von C. difficile bei deutschen und ausländischen Kindern sowie bei weiblichen und männlichen Personen wurden unternommen.

Dabei wurde die Vierfeldertafel zum Vergleich prozentualer Häufigkeiten und der modifizierte Vorzeichentest nach McNemer verwendet. Es ergab sich eine hochsignifikant häufigere Trägerrate bei den ausländischen Kindern, während der Nachweis von C. difficile unabhängig vom Geschlecht zu sein scheint.

Tabelle 15: Häufigkeit von C. difficile bei gesunden Kindern

Altersgruppe	n	Ausländer n	%	Nachweis von C. difficile n	%	Ausländer n	%
Neugeborene bis 3 Tage alt	57	9	15,7	1	1,8	0	0
	♀	4	11,7	1	25,0	0	0
	♂	5	21,7	0	0	0	0
Kinder 2 Monate bis ≤ 1 Jahr	68	28	41,2	33	48,5	16	48,4
	♀	14	48,3	13	44,8	9	69,2
	♂	14	35,9	20	51,3	7	35,0
Kinder > 1 bis 2 Jahre alt	79	37	46,8	9	11,4	6	66,6
	♀	19	50,0	4	10,5	2	50,0
	♂	18	43,9	5	12,2	4	80,0
Kinder 5-13 Jahre alt	204	20	9,8	8	3,9	3	37,5
	♀	14	12,7	7	6,4	3	42,8
	♂	6	6,4	1	1,1	0	0

Tabelle 16: Häufigkeit von C. difficile bei gesunden Erwachsenen

Altersgruppe	n	Nachweis von C. difficile n	%
Erwachsene 20-30 Jahre alt	200	3	1,5
	♀ ♂	3 0	2,6 0
Erwachsene 40-60 Jahre alt	200	1	0,5
	♀ ♂	1 0	0,8 0
Erwachsene >60 bis 93 Jahre alt	201	2	0,9
	♀ ♂	2 0	1,2 0

7.2.4 Häufigkeit von C. difficile in einer Sondergruppe

Die Gruppe umfaßt 27 Mitarbeiter der Außenstelle für Med. Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts im Klinikum Großhadern, 3 Männer und 24 Frauen im Alter von 20 bis 50 Jahren.

C. difficile konnte bei 3 Personen (11%) nachgewiesen werden.

Damit war die Inzidenz in dieser Gruppe deutlich höher als bei den übrigen Erwachsenen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 17: Häufigkeit von C. difficile in einer Gruppe mit zu erwartender höherer Inzidenz

Anzahl n	Nachweis von C. difficile	n	%
27		3	11
♀ 24		3	12,5
♂ 3		0	0

7.3 Einfluß der verwendeten Kulturmedien - CCFA und CCFB - auf den Nachweis von C. difficile

In der Studie sollte auch der Einfluß verschiedener Kulturverfahren auf den Nachweis von C. difficile geprüft werden und zwar der Ausstrich auf CCFA, die Beimpfung von CCFB mit anschließender Subkultur auf CCFA und der Ausstrich auf TCCFA.

Aus 1008 der in der Studie untersuchte Stuhlproben konnte in 57 Fällen (5,6%) C. difficile isoliert werden, 4 (0,4%) auf CCFA, 30 (3,0%) mit Hilfe von CCFB und einmal (0,1%) auf TCCFA.

Mit CCFA und CCFB bei paralleler Anwendung wurden 22 (2,2%) Stämme isoliert.

Aus 204 Stuhlproben von gesunden Kindern unter zwei Jahren wurden insgesamt 43 Stämme (21,1%) mit Hilfe aller drei Kulturverfahren gezüchtet.

Der Ausstrich auf CCFA allein ergab 4 (2,0%) Isolate, die Beimpfung von CCFB und nachfolgender Subkultur auf CCFA 19 (9,3%), das sind 15 (375%) mehr als auf CCFA allein. Auf TCCFA wurde kein Stamm gefunden. Der Nachweis von C. difficile konnte nur um ein Isolat (0,5%) gesteigert werden, wenn CCFA und CCFB gleichzeitig verwendet wurden.

Aus 804 Stuhlproben von gesunden Personen (Kindern $\geq$ 6 Jahren und Erwachsenen) wurden 14 (1,7%) Stämme isoliert. Dabei wurde kein Stamm auf CCFA und 11 (1,3%) Stämme mit Hilfe von CCFB nachgewiesen. Die gleichzeitige Anwendung von CCFA und CCFB ergab 2 (0,25%) Isolate. Ein Stamm (0,12%) wurde nur auf TCCFA gefunden.

Nimmt man die Gesamtzahl der isolierten Stämme von C. difficile als 100%, dann brachte die Kultur auf CCFA 4 (7,0%) in der Gruppe der Kinder unter zwei Jahren und 0 in der Gruppe der älteren Kinder und Erwachsenen. Die Beimpfung von CCFB mit anschließender Subkultur auf CCFA ergab entsprechend 19 (33,3%) und 11 (19,3%).

Die geringe Nachweisrate auf TCCFA, auf dem nur ein Stamm von C. difficile (1,75%) in der Gruppe der älteren Kinder und Erwachsenen gefunden wurde, hat diese Ergebnisse nicht beeinflusst.

Wurden CCFA und CCFB gleichzeitig verwendet, so wurde C. difficile in der Gruppe der Kinder unter zwei Jahren in 20 Fällen (35,1%) und in nur 2 Fällen (3,5%) bei den älteren Kindern und Erwachsenen isoliert.

Die statistische Prüfung im modifizierten Vorzeichentest nach McNemer ergab, daß die Nachweisraten mit Hilfe der Kultur in CCFB der Kultur auf CCFA hochsignifikant ($p=0,01$) überlegen waren. Demgegenüber erhöht die gleichzeitige Verwendung von CCFB und CCFA/CCFB die Nachweisrate nicht signifikant.

Die den Berechnungen zugrundeliegenden Zahlen sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Einfluß der verwendeten Kulturmethoden auf den Nachweis von *C. difficile*

Altersgruppe	n	Nachweis von <i>C. difficile</i>		Verteilung auf die verschiedenen Kulturmethoden							
		n	%	CCFA n	%	CCFB n	%	CCFA und CCFB n	%	TCCFA n	%
Kinder ≤ 2 Jahre	204	43	21,1	4	9,3	19	44,2	20	46,5	0	0
ältere Kinder ≥ 6 Jahre und Erwachsene	804	14	1,7	0	0	11	78,6	2	14,2	1	7,1
Gesamt	1008*	57	5,6	4	7,0	30	52,6	22	38,6	1	1,7

* Es wurden insgesamt 1009 Stuhlproben untersucht, dabei stammte eine Probe von einem Kind im Alter von fünf Jahren.

8.0 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie werden in der Reihenfolge diskutiert, in der sie im Methoden- und Ergebnisteil dargestellt wurden.

8.1 Empfindlichkeit der Nachweismethoden

Der Cefoxitin-Cycloserin-Fruktose-Agar wurde, kurz nachdem die Bedeutung des *C. difficile* in der Ätiologie der Antibiotika-assoziierten Colitis geklärt war, entwickelt (39).

Dieser Selektivnährboden wurde vielfach modifiziert: durch Verwendung unterschiedlicher Basismedien (17, 133), durch Konzentrationsänderungen von Cefoxitin und Cycloserin (17, 69, 94, 133) oder durch Zugabe anderer Antibiotika (24).

Die Modifikationen verbesserten die Leistungsfähigkeit des ursprünglichen CCFA jedoch nicht, sondern minderten sie sogar, vor allem dann, wenn geringere Konzentrationen von Cycloserin und Cefoxitin verwendet wurden (94).

Dennoch zeigte sich auch der modifizierte CCFA anderen nicht selektiven Nachweismedien, wie zum Beispiel Reinforced Clostridial Broth, Brucella Base Blood Agar und Brain-heart-infusion-Agar (17, 133) als überlegen.

Die Empfindlichkeit von CCFA wurde oft geprüft und mit 10^3 KBE/g Stuhl bestimmt (39, 104).

Diese Angaben entsprechen weitgehend unseren eigenen Ergebnissen, denn bei unseren Untersuchungen lag die Nachweisempfindlichkeit zwischen $1,7 \times 10^3$ und $5,9 \times 10^3$ KBE/g Stuhlsuspension.

Niedrigere Keimzahlen als 1000 KBE/g Stuhlsuspension konnten bei uns auf festem Nährboden nicht nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Der Gedanke lag nahe, dieses als Agarnährboden so bewährte Medium auch in flüssiger Form zu verwenden.

Wir verwendeten in unserer Studie eine Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (6.1.2) und ermittelten untere Nachweisgrenzen von 40-80 KBE/g Stuhlsuspension, was einer Steigerung der Nachweisrate gegenüber CCFA um ein bis zwei Zehnerpotenzen entspricht.

Bei der statistischen Prüfung im modifizierten Vorzeichentest nach McNemer ist dieser Unterschied hochsignifikant. Die besten Ergebnisse wurden jedoch in der Kombination beider Nachweismedien erreicht, jedoch erwies sich der Unterschied gegenüber der Verwendung von CCFB allein dann als nicht mehr signifikant.

In der Literatur existieren keine Angaben über die Empfindlichkeit der CCFB, wohl aber zu anderen Anreicherungsverfahren mit recht unterschiedlichen Ergebnissen (24, 53, 70, 91).

Dabei wurde die Empfindlichkeit der verwendeten Anreicherungsverfahren leider nie angegeben, sondern qualitativ, nicht aber quantitativ mit CCFA verglichen.

Während HOLST et al (53) und O'FARRELL et al (91) keinen oder nur einen geringen Vorteil in der Verwendung eines Anreicherungsmediums bei Stuhlproben sahen, ermittelten LEVETT (70), BUCHANAN (22) und CARROLL (24) eine Steigerung der Nachweisraten um 100% bzw. um 30%. O'FARRELL et al (91) fand sogar eine Steigerung der Nachweisrate um den Faktor 10 bei der Untersuchung von Vaginalabstrichen und führte das auf die im Vergleich zu Stuhlproben zu erwartenden geringen Keimzahlen zurück.

Ganz entscheidende Bedeutung hat aber die Frage nach der Belastbarkeit der CCF-Bouillon. Die vorliegende Studie war so konzipiert, daß mit hochempfindlichen Nachweismethoden noch möglichst geringe Keimzahlen nachgewiesen werden sollten.

Während ein Agarnährboden wie CCFA naturgemäß nur mit einer geringen Menge Stuhl beimpft werden kann, konnten wir die CCF-Bouillon im Verhältnis 1:10 mit Stuhl belasten. Höhere Einwaagen wurden nicht geprüft. Über derartige Versuche wurde bisher nichts publiziert.

Einen anderen Aspekt der Problematik bietet die Versporung des *C. difficile*. Über Nährböden, die das Auskeimen von Sporen fördern sollen, wurde vielfach berichtet.

Dabei zeigten sich Gallensäuren als förderlich, und es wurde der TCCFA, der auf der Basis von CCFA hergestellt wird, entwickelt (134). Die beiden Nährböden wurden im Hinblick auf den Nachweis der vegetativen und der Sporenform von *C. difficile* miteinander verglichen. WILSON et al (134) und BUGGY et al (23) erkannten keinen signifikanten Unterschied zwischen TCCFA und CCFA beim Nachweis der vegetativen Form von *C. difficile*, dagegen erwies sich der TCCFA dem CCFA beim Nachweis der Sporenform des *C. difficile* als signifikant überlegen.

Auch ein Flüssigmedium auf der Basis des TCCFA wurde hergestellt. BUGGY et al (23) sah allerdings keinen nennenswerten Vorteil gegenüber dem festen Medium.

Der TCCFA wurde auch in der vorliegenden Studie untersucht. Obwohl dieses Medium in anderen Prüfungen eine hohe Nachweisempfindlichkeit gezeigt hatte (23, 134, 135) hat dieser Nährboden in unserer Studie enttäuschende Ergebnisse gebracht.

Aus 57 positiven Stuhlproben wurde *C. difficile* nur in 4 Fällen auf TCCFA nachgewiesen und in nur einem Fall wurde *C. difficile* allein auf TCCFA nachgewiesen.

Andere Autoren untersuchten, ob 100%-iges Äthanol, wenn er mit der Probe im Verhältnis 1:1 vermischt wird, die Nachweisrate von *C. difficile* erhöht. Im Rahmen ihrer Untersuchungen stellten BORRIELLO (17) und WILLEY (133) fest, daß die Alkoholschockmethode keinen Vorteil gegenüber Selektivmedien hat, jedoch bei Nichtselektivmedien durch Reduktion der Gesamtkeimzahl gewisse Vorteile bringt. LEVETT (69) fand, daß der Alkoholschock die Nachweisrate von *C. difficile* sogar senkt, wenn Anreicherungsmedien verwendet werden. Die spezielle Problematik des Sporennachweises wurde in unserer Studie nicht weiter verfolgt.

Die Ergebnisse dieser und anderer Studien zeigen, daß CCFA und CCFB und vor allem die Kombination beider Nährmedien den bisher besten Nachweis von *C. difficile* möglich macht. Deshalb wurde diese Methode für die Durchführung der Studie über die Häufigkeit von *C. difficile* in der gesunden Bevölkerung gewählt.

Im Rahmen dieser Studie wurden auch Untersuchungen zur Lebensfähigkeit von *C. difficile* angestellt. Dabei hat sich ergeben, daß *C. difficile* in den Stuhlproben unter allen experimentellen Bedingungen, also im Kühlschrank, bei Umgebungstemperatur und im Brutschrank bei 37°C, zwei Wochen lang uneingeschränkt nachweisbar blieb. Dieses Ergebnis liegt weit unter den in der Literatur angegebenen Werten für Sporen (40, 87) und könnte durch die experimentellen Bedingungen vielleicht erklärt werden.

Dieser begleitende Versuch hatte nur den Zweck, zu prüfen, ob der Nachweis durch die Transportzeit beeinflusst werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden aufgrund der kurzen Lagerungszeit von höchstens zwei Tagen nicht negativ beeinflusst.

8.2 Vorkommen von C. difficile bei Gesunden

Über das Vorkommen von C. difficile bei Gesunden gibt es inzwischen eine außerordentlich reichhaltige Literatur, die in Tabelle 2 annähernd erschöpfend dargestellt ist.

Pauschale Angaben zum Vorkommen von C. difficile sind nicht möglich. Die Ergebnisse müssen sehr differenziert, beispielsweise nach Altersgruppen und regionalen Unterschieden, betrachtet werden, wobei allerdings für Mittel- und Nordeuropa gleiche Bedingungen angenommen werden können.

Die in Tabelle 2 angegebenen Zahlen sind stark beeinflusst von den verwendeten Nachweismethoden, den untersuchten Altersgruppen, der Anzahl der untersuchten Personen und den geographischen Gegebenheiten. In den meisten Untersuchungen wurde jedoch der CCFA nach GEORGE (39) verwendet. Flüssigmedien wurden nur sehr selten angewandt (16, 50, 67, 98, 110) und die ermittelten Werte unterscheiden sich nur geringfügig von den auf Festnährböden bestimmten Zahlen.

In dieser Studie konnten bei Verimpfung einer größeren Menge Untersuchungsmaterials in das Flüssigmedium CCFB und gleichzeitiger Kultur auf CCFA aus 1009 Stuhlproben in 57 Fällen C. difficile nachgewiesen werden.

Da es in den verschiedenen Altersklassen Unterschiede hinsichtlich der Besiedelungsrate mit C. difficile gibt, wurden auch bei uns verschiedene Kollektive gebildet: Neugeborene, Kleinkinder, ältere Kinder und Erwachsene. Die Kleinkinder und die Erwachsenen wurden nochmals unterteilt; die Kleinkinder in zwei Gruppen, von 2-12 Monaten und von über einem Jahr bis zu zwei Jahren und die Erwachsenen in drei gleichstarke Gruppen, von 20-30 Jahren, von 40-60 Jahren und von über 60 Jahren.

In dieser Studie wurde bei Neugeborenen C. difficile nur einmal bei einem Mädchen nachgewiesen. Das ergibt eine Häufigkeit von 1,8%. Ähnliche Angaben mit vergleichbarer Nachweismethode wurden von SVEDHAM et al (113) und MERIDA et al (83) gemacht. Wesentlich höhere Werte wurden von MALAMOU-LADAS et al (80) mit 27,5% und von AL-JUMAILI et al (2) mit 71% ermittelt.

In der Literatur schwanken die Nachweisraten bei Neugeborenen, je nach verwendeter Nachweismethode und Anzahl der Untersuchten, von 0-71%. Ein anderes Problem ist in dieser Gruppe die Abgrenzung gegenüber Frühgeborenen und Kleinkindern.

Die Kleinkinder waren nach den Ergebnissen aller Untersuchungen die Gruppe mit der höchsten Inzidenz . Die Trägerrate von *C. difficile* liegt in dieser Gruppe zwischen 8,7% und 53% (Tabelle 2).

In der vorliegenden Untersuchung ergab sich ein Wert von 48,5% bei den Kindern zwischen 2-12 Monaten und von 11,4% bei den Kindern über einem Jahr bis zu zwei Jahren.

Deutlich niedrigere Werte in der erstgenannten Altersgruppe wurden von SNYDER (109) mit 9,3% und von SVEDHAM et al (113) mit 17% angegeben. Alle anderen Ergebnisse stimmten weitgehend mit unseren überein. Detaillierte Angaben für die Kinder zwischen ein bis zwei Jahren fehlen leider.

Kinder im Alter zwischen 5 und 13 Jahren waren in dieser Untersuchung zu 3,9% Träger von *C. difficile*.

Diese Gruppe wurde aber bisher nie gesondert untersucht, so daß Vergleichsdaten fehlen.

Die geringe Nachweisrate, die weitgehend der der Erwachsenen in unserer Untersuchung entspricht, war der Anlaß, diese Gruppe bei den statistischen Berechnungen der der Erwachsenen zuzuschlagen.

Unter 601 Erwachsenen wurde *C. difficile* nur bei 6 Personen, also bei 1%, nachgewiesen. Unterschiede in den einzelnen Altersgruppen waren bei diesen Zahlen statistisch nicht zu errechnen.

Der von uns ermittelte Wert entspricht ziemlich genau den Ergebnissen von MÖLLBY et al (85), liegt aber auch im Bereich aller anderen angegebenen Werte (Tabelle 2).

Deutlich höhere Trägerraten wurden von NAKAMURA (88) angegeben.

Er fand *C. difficile* bei 15,4% der Erwachsenen im Alter zwischen 22 und 28 Jahren und bei 7% der Erwachsenen im Alter zwischen 60 und 90 Jahren, was ein Hinweis auf geographische Unterschiede in der Trägerhäufigkeit von *C. difficile* sein könnte.

ARONSSON beschrieb 1982 (4) und 1985 (5) einen erhöhten Anteil an weiblichen Personen unter den an *C. difficile*-induzierter Enterokolitis erkrankten Patienten. Deshalb wurde hier auch die Geschlechterverteilung analysiert. Die statistische Prüfung ergab sowohl bei den Kindern, als auch bei den Erwachsenen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Dagegen fiel auf, daß der Anteil an Ausländern unter den Kindern, die Träger von *C. difficile* waren, sehr hoch war. Der Unterschied zu den Kindern deutscher Herkunft konnte auch statistisch belegt werden.

HOLST et al (53) ermittelten keinen signifikanten Unterschied in den Trägerraten zwischen schwedischen und ausländischen Kindern, während VISCIDI et al (126) eine höhere Durchseuchung mit *C. difficile* bei Erwachsenen aus Panama im Vergleich zu amerikanischen Erwachsenen feststellten.

Unsere Ergebnisse und die von VISCIDI et al (126) deuten jedenfalls darauf hin, daß es neben den bekannten Altersunterschieden auch noch geographische oder sozioökonomische Unterschiede bezüglich der Trägerate von *C. difficile* geben kann.

Über häufigere Erkrankungen bei Ausländern ist bisher nichts bekannt.

Im Rahmen dieser Untersuchungen war es auch von Interesse, ob unter den Gesunden Gruppierungen mit höherer Trägerate von *C. difficile* existieren.

Gruppen mit zu erwartender höherer Inzidenz sind Ärzte, Pflegepersonal und Laborpersonal. Wir untersuchten deshalb 27 Mitarbeiter der Außenstelle für Medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts am Klinikum Großhadern.

Es ergab sich tatsächlich eine höhere Trägerate von 11%.

Vergleichbare Untersuchungen von KIM et al (61) ergaben eine Trägerate von 18% beim Pflegepersonal, während HEINZMANN et al (138) bei 7 untersuchten Ärzten und Krankenschwestern in keinem Fall *C. difficile* nachweisen konnten.

Da sich bei der Organisation dieser Studie teilweise erhebliche Schwierigkeiten, die fast zum Scheitern der Studie geführt hätten, ergaben, soll hier auch über diese Probleme und deren Bewältigung berichtet werden.

Es war außerordentlich schwierig, Stuhlproben von Schulkindern, von Kleinkindern und von Erwachsenen von mehr als 60 Jahren zu erhalten.

Die für die Kinder im Alter zwischen 5 und 13 Jahren zuständigen Behörden, also das Kultusministerium, das Schulreferat und das Staatliche Schulamt, konnten die Untersuchung an Schulen, obwohl die Schulärzte und das Gesundheitsamt der Stadt München ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie zugesagt hatten, allein deshalb nicht genehmigen, weil kein erhebliches pädagogisch-wissenschaftliches Interesse zu erkennen sei.

Man hätte entweder auf diese wichtige Gruppe verzichten müssen oder sich doch zumindest mit einer erheblich geringeren Teilnehmerzahl begnügen müssen, wenn es nicht möglich gewesen wäre über das

Schulreferat die Genehmigung für die Durchführung dieser Studie an städtischen Tagesheimen zu erhalten und sich nicht noch einige private Schulen bereit erklärt hätten, die Untersuchung zu unterstützen.

Auch die Untersuchung von Kleinkindern bereitete Schwierigkeiten, da das Städtische Jugendamt erst nach langer Wartezeit den Zugang zu den Kinderkrippen ermöglichte.

Während dieser langen Wartezeit gelang es jedoch die Zusage privater, paritätischer und kirchlicher Institutionen auf unbürokratische Art zu erhalten, so daß Kinder in städtischen Kinderkrippen schließlich nicht mehr untersucht wurden.

Auch die Untersuchung der älteren Erwachsenen über 60 Jahre verlief nicht ganz problemlos. Auch hier waren Geduld und beträchtliche Mühe notwendig, um die Genehmigung des zuständigen Sozialamtes für die Durchführung dieser Studie an städtischen Seniorenwohnheimen zu erhalten. Wie schon bei den vorher genannten Gruppen, erklärten sich auch hier wieder private, kirchliche und paritätische Organisationen bereit, die Studie zu unterstützen.

Aus dieser epidemiologischen Studie ergibt sich somit auch die Erkenntnis, daß derartige Untersuchungen, obwohl die Beteiligung daran freiwillig und absolute Anonymität gewährleistet ist, in Deutschland offenbar wesentlich schwieriger durchzuführen sind, als dies anderswo der Fall zu sein scheint.

Vergleichbare Untersuchungen wurden auch in anderen Ländern durchgeführt, so in Schweden, England, Amerika und Japan, von solchen Hindernissen wurde aber nie berichtet.

8.3 Ökologie und Epidemiologie von C. difficile

Wie diese Untersuchungen wiederum bestätigt haben, ist *C. difficile* als Bestandteil der physiologischen Besiedelung des Darmes bei Kindern zu werten.

Bezüglich der Übertragungswege auf Neugeborene gibt es unterschiedliche Meinungen.

Einige Autoren vermuten, daß *C. difficile* während der Geburt von der Mutter auf das Kind übertragen wird, so HAFIZ et al (47), TABAQCHALI et al (114) und DONTA (31), die in Vaginalabstrichen häufig *C. difficile* fanden.

LARSON (68) und BOLTON (16) dagegen konnten bei den Müttern von Kindern, die mit *C. difficile* besiedelt waren, das Bakterium in Vaginalabstrichen nicht entdecken.

MALAMOU-LADAS (80) hat dagegen *C. difficile* aus den Stühlen von Kindern isoliert, die per Sectio geboren worden waren.

Deshalb wird heute eher eine exogene Übertragung angenommen, da *C. difficile* sehr häufig aus der unbelebten Umgebung sowie von den Händen von Patienten mit AAC und des Pflegepersonals isoliert werden konnte (2, 35, 40, 61, 62, 81, 106).

Außerdem wurde *C. difficile* auch in Pferde-, Esel- und Kamelung sowie bei Seehunden und in Erde und Sand gefunden (48, 139).

In mehreren Untersuchungen wurden Epidemien auf Krankenstationen beschrieben, die durch identische Stämme von *C. difficile* hervorgerufen worden waren (51, 95). In einer Studie von MALAMOU-LADAS (80) wurde festgestellt, daß sie Stämme von *C. difficile* aus den Stühlen Neugeborener oft das gleiche Antibiotogramm zeigten.

THOMPSON (119) nimmt an, daß beide Übertragungswege bei Neugeborenen die gleiche Rolle spielen, da er auf zwei verschiedenen Stationen einmal bei 2% und ein anderes Mal bei 52% der Kinder gleichen Alters und Gesundheitszustandes *C. difficile* nachweisen konnte.

Er stellte dabei die Überlegung an, daß niedrigere Trägerraten bei Neugeborenen möglicherweise mit der Übertragung während der Geburt zu erklären sind, während hohe Werte eher für eine exogene Übertragung sprechen könnten.

Da die Säuglinge und Kleinkinder die Gruppe mit der höchsten Inzidenz in allen Untersuchungen bildete, vermuteten einige Autoren, wie STARK et al (141), daß neben dem Lebensalter auch die Ernährung einen Einfluß auf die Besiedelung des Colons mit *C. difficile* haben könnte.

SMITH und CRABB (108) stellten fest, daß sich die Darmflora von Neugeborenen und Tieren stark ähnelt, solange sie ausschließlich mit Muttermilch ernährt wurden und sich Abweichungen erst zeigten, wenn andere Nahrung gegeben wurde.

ROLFE (102) konnte an Hamstern demonstrieren, daß Fettsäuren das Wachstum von *C. difficile* hemmen können und höchste Fettsäurewerte erreicht wurden, wenn die Jungtiere nicht mehr ausschließlich von Muttermilch ernährt wurden.

Auch SNYDER (110) beobachtete bei Kindern eine Änderung in der Zusammensetzung der Darmflora, wenn sie nicht mehr allein von Muttermilch ernährt wurden.

Darüberhinaus stellte er, wie auch BORRIELLO et al (19) und STARK et al (111), noch eine inhibitorische Wirkung der Muttermilch auf sporulierende Anaerobier wie *C. difficile*, fest.

WADA et al (128) zeigten in einem in vitro-Versuch, daß humanes Kolostrum und darin besonders IgA und Laktalbumin das Toxin B teilweise zu neutralisieren vermögen.

KIM et al (63) konnten diese Neutralisationswirkung auch gegenüber Toxin A feststellen und in einem in vivo-Versuch mit neugeborenen Mäusen für beide Toxine über zwei bis drei Monate hinweg beobachten. KIM et al (63) sahen deshalb einen Zusammenhang zwischen der Neutralisationswirkung von Kolostrum und Muttermilch und der kindlichen Toleranz gegenüber *C. difficile* und seinen Toxinen.

Ob allerdings zwischen diesem Neutralisationseffekt und einer bereits durchgemachten mütterlichen Infektion mit *C. difficile* auch ein Zusammenhang besteht, wurde in der Studie nicht geklärt.

Umgekehrt stellten andere Autoren fest, daß bei Kindern, die mit der Flasche ernährt wurden, häufiger *C. difficile* nachgewiesen wurde. So zeigten COOPERSTOCK et al (27) eine 4 mal höhere Nachweisrate im Vergleich zu den Kindern, die mit Muttermilch ernährt wurden. Kinder, die mit beidem ernährt wurden, nahmen eine Zwischenstellung ein.

Während RICHARDSON et al (98) keinen signifikanten Unterschied in der Besiedelungsrate von Säuglingen sahen, der von der Ernährungsform abhängig war, kamen DONTA und MEYERS (31) sogar zu einem gegenteiligen Schluß. Sie konnten *C. difficile* häufiger bei Kindern isolieren, die ausschließlich mit Muttermilch ernährt wurden und erklärten dies mit der Übertragung der mütterlichen Flora auf den Säugling.

Inwieweit die Ernährungsform die Besiedelung des Colons mit *C. difficile* beeinflußt, konnte in unserer Studie aufgrund der Versuchsanordnung (6.6.1) nicht ermittelt werden.

Hinweise dafür, daß *C. difficile* nur zeitlich begrenzt in der normalen Darmflora nachzuweisen ist, ergeben die Studien, die einen starken Abfall der Nachweisraten nach abgeschlossenem ersten Lebensjahr beschreiben (48, 53).

Beobachtungen von ROLFE (102) an Tieren ergaben, daß *C. difficile* bei jungen Hamstern nur zwischen dem 4. und 12. Lebenstag nachweisbar war, während der Nachweis ab dem 13. Lebenstage nicht mehr gelang. Diese Ergebnisse lassen sich nach der Untersuchung von HOLST (53) möglicherweise auch auf den Menschen übertragen. Er zeigte, daß bei Kindern, die jünger als ein Monat oder älter als neun Monate waren, *C. difficile* nur zu 4% gefunden wurde, während das bei Kindern im Alter von ein bis acht Monaten noch bei 64% der Untersuchten möglich war. Das Maximum lag in der Altersgruppe zwischen drei und fünf Monaten.

Heute wird angenommen, daß sich sowohl bei Jungtieren, als auch beim Menschen, die Darmflora im entsprechenden Alter stabilisiert hat und durch Interferenzwirkung konkurrierender Bakterien, wie *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp. und anaeroben Kokken (111), *Bifidobakterien*, *Laktobazillen* und *Streptokokken* (101) die Wachstumsbedingungen für *C. difficile* drastisch gemindert werden.

Im Tierversuch zeigte DABARD (28) an neugeborenen Hasen, daß diese leicht mit *C. difficile* zu infizieren waren, während dies bei ausgewachsenen Tieren mit bereits voll entwickelter Darmflora nicht mehr ohne weiteres möglich war.

Basierend auf diese Untersuchungsergebnisse stellten AL-JUMAILI et al (2) die Überlegung an, daß *C. difficile* möglicherweise in einer sehr geringen Keimzahl noch beim Erwachsenen vorhanden sein könnte, dem Nachweis jedoch aufgrund der Wachstumshemmung durch die Begleitflora und aufgrund des Inhibitionseffektes des Selektivmediums entginge.

Eine ähnliche Hypothese liegt auch dieser Studie zugrunde.

Trotz dieser Untersuchungen ist immer noch nicht geklärt, warum Kinder, unabhängig vom Gesundheitszustand, Antibiotikatherapie und Klinikaufenthalt vor allem im ersten Lebensjahr so häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* sind und oft auch Toxintiter in einer Höhe aufweisen, wie sie auch bei erwachsenen Patienten mit PMC gefunden wurden (67, 72, 99, 126).

Einigkeit besteht inzwischen darüber, daß *C. difficile* und auch seine Toxine nicht in jedem Falle eine PMC auslösen müssen (61, 72). Zur Erklärung dieses Phänomens sollen hier abschließend einige Überlegungen zitiert werden.

KIM et al (61) postulierten eine passive Immunität bei Kindern, durch über die Muttermilch übertragene Antitoxine (79).

DONTA und MEYERS (31) sprechen ebenfalls von einem Faktor, der das Toxin bei Kindern aktiviert, noch bevor Schäden auftreten können.

Andere Autoren vermuten bei Kindern nicht ausgereifte oder maskierte Bindungsstellen für die Toxine von *C. difficile* im kindlichen Darm. (26, 31, 61) oder von einem eventuell vorhandenen Resistenzfaktor der Mukosa (26). Dadurch ist das kindliche Colon möglicherweise unempfindlich gegen die Toxineffekte.

Unter Umständen können manche Erwachsene diese lokale oder systemische Resistenz bewahren (16, 34, 72).

BORRIELLO und BARCLAY (20) zeigten, daß eine frühere Besiedelung von Clindamycin-behandelten Goldhamstern mit Toxin-negativen Stämmen von *C. difficile*, die Tiere gegen eine spätere Infektion mit zytotoxischen Stämmen schützt.

Dieses Untersuchungsergebnis könnte auch auf den Menschen übertragen werden. Studien zu diesem Thema liegen nicht vor.

ROLFE (140) erörterte den Einfluß der Adhärenz an Zellen auf die unterschiedliche Krankheitshäufigkeit bei Trägern von *C. difficile* und auch auf die Nachweishäufigkeit, wobei die Anhaftung sowohl von Individuum zu Individuum als auch von Stamm zu Stamm verschieden sein kann.

VESIKARI et al (124) sprechen sich für einen Schutzfaktor gegenüber der *C. difficile*-induzierten Enterokolitis bei Kindern aus, während sie bei Erwachsenen eher einen krankheitsfördernden Kofaktor erwägen.

TAYLOR et al (116) hielten eine gleichzeitige Infektion mit Salmonellen und mit *C. difficile* für die Ursache der PMC. Auch NASH et al (89) und FALSEN et al (34) stellten fest, daß 20% bzw. 36% der Träger von *C. difficile* auch zugleich mit Salmonellen, Shigellen und *Campylobacter* infiziert waren.

ELLIS et al (33) diskutierten schließlich einen Virusinfekt als Auslöser für Toxinproduktion und Proliferation von *C. difficile*.

9.0 Zusammenfassung

- In der vorliegenden Studie sollte die Häufigkeit von *Clostridium difficile*, dem wahrscheinlich wichtigsten Erreger der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Colitis, in der gesunden Bevölkerung aus der näheren Umgebung Münchens untersucht werden. Die Teilnehmer sollten keine Antibiotika erhalten, nicht an Darmerkrankungen leiden und sich nicht in stationärer Behandlung befinden.
- Als Vergleichsgruppe mit zu erwartender höherer Inzidenz wurden 27 Mitarbeiter der Außenstelle für Medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts im Klinikum Großhadern untersucht.
- Eine Nebenaufgabe war die Bestimmung der Empfindlichkeit der verwendeten Nachweismethoden und die Bestimmung der Überlebensfähigkeit von *C. difficile* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (4°C, 20°C, 37°C).
- In der Studie wurden als Agarmedien der Cefoxitin-Cycloserin-Fruktose-Agar (CCFA Oxoid CM 601) und der Taurocholat-Cycloserin-Fruktose-Agar (TCCFA) verwendet. Als flüssiges Anreicherungsmedium diente die Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Bouillon (CCFB), die im Verhältnis von 1:10 mit Stuhl beimpft wurde.
- *Clostridium difficile* wurde in folgender Häufigkeit nachgewiesen:

Neugeborene	(bis 3 Tage)	1,75%
Kinder	(2-12 Monate)	48,5 %
Kinder	(>1-2 Jahre)	11,4 %
Kinder	(5-13 Jahre)	3,9 %
Erwachsene	(20-30 Jahre)	1,5 %
Erwachsene	(40-60 Jahre)	0,5 %
Erwachsene	(>60 Jahre)	0,5 %
Laborpersonal	(20-50 Jahre)	11,0 %
- Statistische Berechnungen zum Vergleich der Trägerraten von *C. difficile* bei deutschen und ausländischen Kindern, sowie bei weiblichen und männlichen Personen wurden unternommen. Dabei wurde die Vierfeldertafel zum Vergleich prozentualer Häufigkeiten und der modifizierte Vorzeichentest nach McNemer verwendet. Es ergab sich eine hochsignifikant häufigere Trägerrate bei den ausländischen Kindern, während die Trägerrate von *C. difficile* unabhängig vom Geschlecht war.
- Die erfolgreichste Nachweismethode bei dieser Untersuchung war die Kombination von CCFB und CCFA.
- Obwohl, so weit möglich, eine größere Stuhlmenge als im Routinelabor verwendet wurde, spielte die Probenmenge nicht die zu erwartende Rolle, da ca. 50% der Nachweisrate von *C. difficile* bei Einwaagen von weniger als 1g Stuhl gefunden wurden.

- Bei der Prüfung der Nachweisempfindlichkeit konnten auf CCFA nur Keimzahlen nachgewiesen werden, die deutlich über 1000 KBE/g Stuhlsuspension lagen, während sich mit dem Anreicherungsmedium CCFB die Nachweisrate um ein bis zwei Zehnerpotenzen steigern ließ.
Die Empfindlichkeit von TCCFA wurde nicht bestimmt, da er bei der epidemiologischen Untersuchung enttäuschende Ergebnisse gebracht hat.
- *Clostridium difficile* war noch nach zwei-wöchiger Lagerungszeit bei 4°C, 20°C und 37°C vermehrungsfähig.
Nach der dritten Woche waren die Erreger teilweise abgestorben. Diese Untersuchung hatte nur den Zweck, zu prüfen, ob der Nachweis durch die Transportzeit beeinflußt werden könnte.
- Die Gründe, warum Kinder, im Gegensatz zu Erwachsenen, so häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* und seinen Toxinen sind, ist bisher noch nicht geklärt.
Die derzeit herrschenden Meinungen zu diesem Punkt wurden vorgestellt und diskutiert.

10.0 LITERATUR

- 1) Adler S., Chandika T., Berman W.F.
Clostridium difficile associated with pseudomembranous colitis.
Am. J. Dis. Child. 135, 820-822 (1981)
- 2) Al-Jumaili I.J., Shibley M., Lishman A.H., Record C.O.
Incidence and origin of Clostridium difficile in neonates.
J. Clin. Microbiol. 19, 77-78 (1984)
- 3) Altemeier W.A., Hummel R.P., Hill E.O.
Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy.
Ann. Surg. 157, 847-858 (1963)
- 4) Aronsson B., Möllby R., Nord C.E.
Clostridium difficile and antibiotic associated diarrhoea in Sweden.
Scand. J. Infect. Dis. 35, 53-58 (1982)
- 5) Aronsson B., Möllby R., Nord C.E.
Antimicrobial agents and Clostridium difficile in acute enteric disease: Epidemiological data from Sweden, 1980-1982.
J. Infect. Dis. 151, 476-481 (1985)
- 6) Banno Y., Kobayashi T., Kono H., Watanabe K., Ueno K., Nozawa Y.
Biochemical characterisation and biologic actions of two toxins (D₁ and D₂) from Clostridium difficile.
Rev. Infect. Dis. 6, 11-20 (1984)
- 7) Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L., Kasper D.C.
Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium difficile in hamsters.
J. Infect. Dis. 136, 701-705 (1977)
- 8) Bartlett J.G., Moon N., Chang T.W., Onderdonk A.B.
Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudo-membranous colitis.
Gastroenterology 75, 778-782 (1978)
- 9) Bartlett J.G., Chang T.W., Gurwith M., Gorbach S.L., Onderdonk A.B.
Antibiotic-associated pseudoembranchous colitis due to a toxin producing clostridia.
New England J. Med. 298, 531-534 (1978)
- 10) Bartlett J.G., Chang T.W., Taylor N.S., Onderdonk A.B.
Clostridium difficile colitis.
Rev. Infect. Dis. 1, 370-378 (1975)
- 11) Bartlett J.G.
Experimental studies of antibiotic-associated colitis.
Scand. J. Infect. Dis. 22 (Suppl.), 11-15 (1980)
- 12) Bartlett J.G., Taylor N.S., Chang T.W., Dzink J.A.
Clinical and laboratory observations in Clostridium difficile colitis.
Am. J. Clin. Nutrition 33, 2521-2526 (1981)
- 13) Batts D., Silva J., Fekety R.
Staphylococcal enterocolitis.
Curr. Chem. Infect. Dis. 2, 944 (1980)
- 14) Block B.S., Mercer L.J., Ismail M.A., Moaward A.H.
Clostridium difficile-associated diarrhoea follows perioperative prophylaxis with cefoxitin.
Am. J. Obstet. Gynecol. 153, 835-838 (1985)

- 15) Boenning D.A., Fleisher G.R., Campos J.M., Hulkower C.W.,
Quinlan R.W.
Clostridium difficile in a pediatric outpatient population.
Pediatric Infect. Dis. 1, 336-338 (1982)
- 16) Bolton R.P., Tait S.K., Dear P.R.F., Losowsky M.S.
Asymptomatic neonatal colonisation by Clostridium difficile.
Arch. Dis. Childhood 59, 466-472 (1984)
- 17) Borriello S.P., Honour P.
Simplified procedure for the routine isolation of
Clostridium difficile from faeces.
J. Clin. Pathol. 34, 1124-1127 (1981)
- 18) Borriello S.P., Larson H.E.
Antibiotic and pseudomembranous colitis.
J. Antimicrob. Chemother. 7 (Suppl. A), 53-62 (1981)
- 19) Borriello S.P., Barclay F.A.
Colonization resistance to Clostridium difficile infection.
Mikroökologie und Therapie 14, 75-87 (1984)
- 20) Borriello S.P., Barclay F.E.
Protection of hamsters against Clostridium difficile ileo-
caecitis by prior colonization with non-pathogenic strains.
J. Med. Microbiol. 19, 339-350 (1985)
- 21) Brettell R.P., Poxton I.R., Murdoch J., Brown R., Byrne M.D.,
Collee J.G.
Clostridium difficile in association with sporadic diarrhoea.
Brit. Med. J. 284, 230-233 (1982)
- 22) Buchanan A.
Selective enrichment broth for detection of Clostridium
difficile and associated cytotoxin.
J. Clin. Microbiol. 20, 74-76 (1984)
- 23) Buggy B.P., Wilson K.H., Fekety R.
Comparison of methods for recovery of Clostridium difficile
from an environmental surface.
J. Clin. Microbiol. 18, 348-352 (1983)
- 24) Carroll S.M., Bowman R.A., Riley T.V.
A selective broth for Clostridium difficile.
Pathology 15, 165-167 (1983)
- 25) Chang T.W., Laueremann M., Bartlett J.G.
Cytotoxin assay in antibiotic-associated colitis.
J. Infect. Dis. 140, 765-770 (1979)
- 26) Cooperstock M.S., Steffen E., Yolken R., Onderdonk A.
Clostridium difficile in normal infants and sudden death
syndrome: an association with infant formula feeding.
Pediatrics 70, 91-95 (1982)
- 27) Cooperstock M.S., Riegle L., Woodruff C.W., Onderdonk A.
Influence of age, sex and diet on asymptomatic colonization
of infants with Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 17, 830-833 (1983)
- 28) Dabard J., Dubos F., Martinet L., Ducluzeau R.
Experimental reproduction of neonatal diarrhoea in young
gnotobiotic hares simultaneously associated with Clostridium
difficile and other Clostridium strains.
Infection Immunity 24, 7-11 (1979)

- 29) Dearing W.H., Baggenstoss A.H., Weed L.A.
Studies on the relationship of *Staphylococcus aureus* to pseudomembranous enteritis and to postantibiotic enteritis.
Gastroenterology 38, 441-451 (1960)
- 30) Donta S.T., Shaffer S.J.
Effect of *Clostridium difficile* toxin on tissue cultured cells.
J. Infect. Dis. 141, 218-220 (1980)
- 31) Donta S.T., Myers M.G.
Clostridium difficile toxin in asymptomatic neonates.
J. Pediatrics 100, 431-434 (1982)
- 32) Dorman S.A., Liggoria E., Winn W.C., Beeken W.L.
Isolation of *Clostridium difficile* from patients with inactive Crohn's disease.
Gastroenterology 82, 1348-1351 (1982)
- 33) Ellis M.E., Mandal B.K., Dunbar E.M., Bundell K.R.
Clostridium difficile and its cytotoxin in infants admitted to hospital with infectious gastroenteritis.
Brit. Med. J. 288, 524-526 (1984)
- 34) Falsen E., Kaijser B., Nehls L., Nygren B., Svedham A.
Clostridium difficile in relation to enteric bacterial pathogens.
J. Clin. Microbiol. 12, 297-300 (1980)
- 35) Fekety R., Kim K.H., Batts D.H., Brown R.A., Cudmore M.A., Silva Jr. J., Toshniwal R., Wilson K.H.
Studies on the epidemiology of antibiotic-associated *Clostridium difficile* colitis.
Am. J. Clin. Nutrition 33, 2527-2532 (1980)
- 36) Finney J.M.
Gastroenterology for cicatrizing ulcer of the pylorus.
Bull. John Hopkins Hosp. 4, 53-54 (1983)
- 37) George R.H., Symonds J.M., Dimock F., Brown J.D., Arabi Y., Shinagawa N., Keighley M.R.B., Alexander-Williams J., Burdon D.W.
Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudo-membranous colitis.
Brit. Med. J. 1, 695 (1978)
- 38) George W.L., Sutter V.L., Finegold S.M.
Toxicogenicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile*, a cause of antimicrobial agent-associated colitis.
Curr. Microbiol. 1, 55-58 (1978)
- 39) George W.L., Sutter V.L., Citron D., Finegold S.M.
Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*.
J. Clin. Microbiol. 9, 214-219 (1979)
- 40) George W.L., Rolfe R.D., Harding G.K.M., Klein R., Putnam C.W., Finegold S.M.
Clostridium difficile and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis.
Infection 10, 205-208 (1982)
- 41) George W.L., Rolfe R.D., Finegold S.M.
Clostridium difficile and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhoea and miscellaneous conditions.
J. Clin. Microbiol. 15, 1049-1053 (1982)

- 42) Gerding D.N., Olson M.M., Peterson L.R., Teasley D.G., Gebhard R.L., Schwartz M.L. Lee J.T.
Clostridium difficile-associated diarrhoea in adults.
A prospective case-controlled epidemiology study.
Arch. Intern. Med. 146, 95-100 (1986)
- 43) Gilligan P.H., McCarthy L.R., Genta V.M.
Relative frequency of Clostridium difficile with diarrheal disease.
J. Clin. Microbiol. 14, 26-31 (1981)
- 44) Goulston S.J.M., McGovern V.J.
Pseudomembranous colitis.
Gut 6, 207-212 (1965)
- 45) Greenfield C., Burroughs A., Szawathowski M., Boss N., Noone P., Pounder R.
Is pseudomembranous colitis infectious ?
Lancet I, 371-372 (1981)
- 46) Greenfield C., Agzilar-Ramirez J.R., Pounder R.E., Williams T., Danvers M., Marper S.R., Noone P.
Clostridium difficile and inflammatory bowel disease.
Gut 24, 713-717 (1983)
- 47) Hafiz S., McEntergart M.G., Morton R.S., Waitkins S.A.
Clostridium difficile in the urogenital tract of males and females.
Lancet I, 420-421 (1975)
- 48) Hafiz S. and Oakley C.L.
Clostridium difficile isolation and characteristics.
J. Med. Microbiol. 9, 129-137 (1976)
- 49) Hale H.W., Cosgriff J.H.
Pseudomembranous enterocolitis.
Am. J. Surg. 94, 710-717 (1957)
- 50) Hall I.C., and O'Toole E.
Intestinal flora in new-born infants with description of a new pathogenic organism Bacillus difficilis.
Am. J. Dis. Child. 49, 390-402 (1935)
- 51) Heard S.R., O'Farrell S., Holland D., Crook S., Barnett J., Tabaqchali S.
The epidemiology of Clostridium difficile with use of a typing scheme: Nosocomial acquisition and cross-infection among immunocompromised patients.
J. Infect. Dis. 153, 159-162 (1986)
- 52) Holdeman L.V., Moore W.E.C.
Anaerobe Laboratory Manual.
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blackburg, Virginia 24061 (1975)
- 53) Holst E., Helin I., Mardh P.-A.
Recovery of Clostridium difficile from children.
Scand. J. Infect. Dis. 13, 41-45 (1981)
- 54) Hyams J.S., Berman M.M., Helgason H.
Nonantibiotic-associated enterocolitis caused by Clostridium difficile in an infant.
J. Pediatr. 99, 750-752 (1981)

- 55) Hyams J.S., McLaughlin J.C.
Lack of relationship between *Clostridium difficile* toxin
and inflammatory bowel disease in children.
J. Clin. Gastroenterology 7, 387-390 (1985)
- 56) Justus P.G., Martin J.C., Goldberg D.A., Taylor N.S.,
Bartlett J.G., Alexander R.W., Mathias J.R.
Myoelectric effects of *Clostridium difficile* motility-
alteration factors distinct from its cytotoxin and entero-
toxins in rabbits.
Gastroenterology 83, 836-843 (1982)
- 57) Keighley M.R.B., Burdon D.W., Arabi Y., Alexander-Williams J.,
Thompson H., Youngs D., Johnson M., Bentley S., George R.H.,
Mogg G.A.G.
Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous
colitis and postoperative diarrhoea.
Brit. Med. J. 2, 1667-1669 (1978)
- 58) Keighley M.R.B., Burdon D.W., Alexander-Williams J., Shingawa N.,
Arabi Y., Thompson H., Youngs D., Bentley S., George R.H.
Diarrhoea and pseudomembranous colitis after gastrointestinal
operations.
Lancet II, 1165-1167 (1978)
- 59) Kelsey M.C., Vince A.J.
Clostridia in neonatal faeces.
Lancet II, 100 (1979)
- 60) Khan M.Y., Hall W.H.
Staphylococcal enterocolitis treatment with oral vancomycin.
Ann. Int. Med. 65, 8 (1966)
- 61) Kim K.H., Fekety R., Batts D.H., Brown D., Cudmore M.,
Silva jr. J., Waters D.
Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and
contacts of patients with antibiotic-associated colitis.
J. Infect. Dis. 143, 42-50 (1981)
- 62) Kim K., DuPont H.L., Pickering L.K.
Outbreaks of diarrhea associated with *Clostridium difficile*
and its cytotoxin in day-care centers:
Evidence of person-to-person spread.
Pediatr. 102, 376-382 (1983)
- 63) Kim K., Pickering L.K., DuPont H.L., Sullivan N., Wilkins T.,
In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum
and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*.
J. Infect. Dis. 150, 57-62 (1984)
- 64) La Mont J.T., Trnka Y.M.
Therapeutic implications of *Clostridium difficile* toxin during
relapse of chronic inflammatory bowel disease.
Lancet I, 381-383 (1980)
- 65) Larson H.E., Parry J.V., Price A.B., Davis D.R., Dolby J.,
Tyrrell D.A.J.
Undescribed toxin in pseudomembranous colitis.
Brit. Med. J. 1, 1246-1248 (1977)
- 66) Larson H.E., Price A.B.
Pseudomembranous colitis of clostridial toxin.
Lancet II, 1312-1314 (1977)

- 67) Larson H.E., Price A.B., Honour P., Borriello S.P.
Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis.
Lancet I, 1063-1066 (1978)
- 68) Larson H.E., Barclay F.E., Honour P., Hill I.D.
Epidemiology of Clostridium difficile in infants.
J. Infect. Dis. 146, 727-733 (1982)
- 69) Levett P.N.
Use of enrichment cultures for the isolation of Clostridium difficile from stools.
Microbios Letters 25, 67-69 (1984)
- 70) Levett P.N., Margaritis-Bassoulis G.
Enrichement media for isolation of Clostridium difficile from faeces.
Eur. J. Clin. Microbiol. 4, 135-136 (1985)
- 71) Libby J.M., Donta S.T., Wilkins T.D.
Clostridium difficile toxin A in infants.
J. Infect. Dis. 148, 606 (1983)
- 72) Lishman A.H., Al-Jumaili I.J., Record C.O.
Spectrum of antibiotic-associated diarrhoea.
Gut 22, 34-37 (1981)
- 73) Löhrs U.
Pathomorphologie der Antibiotika-assoziierten Kolitis.
Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. 3-4, S. 391-396 (1984)
- 74) Loeschke K., Kautz U., Lohrs U.
Effects of antibiotics on caecal electrolyte transport and morphology in rats.
Contribution to the pathogenesis of antibiotic-associated diarrhoea.
Klin. Wschr. 58, 383-385 (1980)
- 75) Loeschke K.
Antibiotika-assoziierte Diarrhoe und Enterocolitis.
Klin. Wschr. 58, 337-345 (1980)
- 76) Loeschke K.
Diagnostik, Therapie und Epidemiologie der Enterokolitis nach Antibiotika.
Inn. Med. 9, 222-228 (1982)
- 77) Loeschke K., Hauck K.R., Halbritter R., Pfaller P., Ruckdeschel G.
Clostridium difficile und Antibiotika-assoziierte Colitis bei Risikopatienten: Zweimonatige epidemiologische Studie auf einer Intensivstation.
Klin. Wschr. 61, 1081-1087 (1983)
- 78) Loeschke K., Tredup J., Ruckdeschel G.
Klinik der Antibiotika-assoziierten Kolitis mit Ergebnis von 110 Patienten aus Krankenhäusern in München.
Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. 3-3, S. 409-418 (1984)
- 79) Lyerly D.M., Lockwood D.E., Richardson S.H., Wilkins T.D.
Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile.
Infection Immunity 35, 1147-1150 (1982)

- 80) Malamou-Ladas H., O'Farrell S., Nash J.G., Tabaqchali S.
Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards.
J. Clin. Pathol. 36, 88-92 (1983)
- 81) Mardh P.-A., Colleen H.I., Öberg M., Holst E.
Clostridium difficile toxin in faecal specimens of healthy children with diarrhoea.
Acta Paediatr. Scand. 71, 275-278 (1982)
- 82) Marrie T.J., Furlong M., Faulkner R.S., Sidorov J., Haldane E.V., Kerr E.A.
Clostridium difficile: Epidemiology and clinical features.
Canad. J. Surg. 25, 438-442 (1982)
- 83) Merida V., Moerman J., Colaert J., Lemmens P., Vandepitte J.
Significance of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in children.
Eur. J. Pediatr. 144, 494-496 (1986)
- 84) Möllby R., Nord C.E., Aronsson B.
Diagnosis of *Clostridium difficile*-associated enterocolitis in Sweden. Laboratory and epidemiological aspects.
Scand. J. Infect. Dis. 22 (Suppl.), 30-36 (1980)
- 85) Möllby R., Aronsson B., Nord C.E.
Ecological aspects on *Clostridium difficile*.
13th Int. Congress Chemother., Wien 1983, Abstr. Nr. 45, S. 8-11
- 86) Morris J.G., Jarvis W.R., Nunez-Montiel O.L., Towns M.L., Thompson F.S., Dowell V.R., Hill E.O., Vogler W.R., Winton E.F., Hughes J.M.
Clostridium difficile. Colonization and toxin production in a cohort of patients with malignant hematologic disorders.
Arch. Intern. Med. 144, 967-969 (1984)
- 87) Mulligan M.E., Rolfe R.D., Finegold S.M., George W.L.
Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*.
Current Microbiol. 3, 173-175 (1979)
- 88) Nakamura S., Mikawa M., Nakashio S., Takabatake M., Okado I., Yamakawa K., Serikawa T., Okumura S., Nishida S.
Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and the antibody in sera of young and elderly adults.
Microbiol. Immunol. 25, 345-351 (1981)
- 89) Nash J.Q., Chattopadhyay B., Honeycombe J., Tabaqchali S.
Clostridium difficile and cytotoxin in routine faecal specimens.
J. Clin. Pathol. 35, 561-565 (1982)
- 90) Nunez-Montiel O.L., Thompson F.S., Dowell jr. V.R.
Norleucine-Tyrosine broth for rapid identification of *Clostridium difficile* by gas-liquid-chromatography.
J. Clin. Microbiol. 17, 382-385 (1983)
- 91) O'Farrell S., Wilks M., Nash J.Q., Tabaqchali S.
A selective enrichment broth for the isolation of *Clostridium difficile*.
Technical Methods 98-99 (1983)
- 92) Peikin S.R., Galdibini J., Bartlett J.G.
Role of *Clostridium difficile* in a case of nonantibiotic-associated pseudomembranous colitis.
Gastroenterology 79, 948-951 (1980)

- 93) Pettet J.D., Baggenstoss A.H., Dearing W.H., Judd jr. E.S.
Postoperative pseudomembranous enterocolitis.
Surg. Gynec. Obstet. 98, 546-552 (1954)
- 94) Phillips K.D., Rogers P.A.
Rapid detection and presumptive identification of *Clostridium difficile* by p-cresol production on a selective medium.
J. Clin. Pathol. 34, 642-644 (1981)
- 95) Poxton I.R., Aronsson B., Möllby R., Nord C.E., Collee J.G.
Immunochemical fingerprinting of *Clostridium difficile* strains isolated from an outbreak of antibiotic-associated colitis and diarrhoea.
J. Med. Microbiol. 17, 317-324 (1984)
- 96) Prohaska J.V., Long E.T., Nelson T.S.
Pseudomembranous enterocolitis its etiology and the mechanism of the disease process.
Arch. Surg. 72, 977-983 (1956)
- 97) Prohaska J.V.
Pseudomembranous enterocolitis the experimental induction of the disease with *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin.
Arch. Surg. 79, 197-206 (1959)
- 98) Richardson S.A., Alcock P.A., Gray J.
Clostridium difficile and its toxin in healthy neonates.
Brit. Med. J. 287, 878 (1983)
- 99) Rietra P.J.G.M., Slaterus K.W., Zanen H.C., Meuwissen S.G.M.
Clostridial toxin in faeces of healthy infants.
Lancet II, 319 (1978)
- 100) Rolfe R.D., Finegold S.M.
Purification and characterisation of *Clostridium difficile* toxin.
Infection Immunity 25, 191-201 (1979)
- 101) Rolfe R.D., Helebian S., Finegold S.M.
Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal fecal flora.
J. Infect. Dis. 143, 470-475 (1981)
- 102) Rolfe R.D.
Role of volatile acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*.
Infection Immunity 45, 185-191 (1984)
- 103) Rosenberg J.M., Walker M., Welch J.P., Mullany L.
Clostridium difficile colitis in surgical patients.
Am. J. Surgery 147, 486-491 (1984)
- 104) Ruckdeschel G., Danninger M., Pfaller P.
Diagnostik und Epidemiologie von *Clostridium difficile*.
Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. 3-4, S.397-402 (1984)
- 105) Ryan R.W., Kwasnik I., Tilton R.C.
Detection of *Clostridium difficile* toxin by Latex-agglutination.
Abstracts 25th Interscience Conference on Antimicrobial Agents, Minneapolis 1985, Nr. 163
- 106) Sherertz R.J., Sarubbi F.A., Hill C.
The prevalence of *Clostridium difficile* and its toxin in a nursery population: A comparison between patients with necrotizing enterocolitis and an asymptomatic group.
J. Pediatr. 100, 435-439 (1982)

- 107) Silva J., Batts D.H., Fekety R., Pflouffee J.F., Rifkin G.D., Baird I.
Treatment of Clostridium difficile colitis and diarrhoea with Vancomycin.
Am. J. Med. 71, 815-822 (1981)
- 108) Smith H.W., Crabb W.E.
The faecal bacterial flora of animals and man:
Its development in the young.
J. Path. Bact. 82, 53-66 (1961)
- 109) Snyder M.L.
Further studies on Bacillus difficilis.
J. Infect. Dis. 60, 223-231 (1937)
- 110) Snyder M.L.
The normal fecal flora of infants between two weeks and one year of age.
J. Infect. Dis. 66, 1-16 (1940)
- 111) Stark P.L., Lee A., Parsonage B.D.
Colonization of the large bowel by Clostridium difficile in healthy infants: Quantitative study.
Infection Immunity 35, 895-899 (1982)
- 112) Sullivan N., Pellet S., Wilkins T.D.
Purification and characterisation of toxins A and B of Clostridium difficile.
Infection Immunity 35, 1032-1040 (1982)
- 113) Svedham A., Kaijser B., MacDowall I.
Intestinal occurrence of Campylobacter fetus subspecies jejuni and Clostridium difficile in children in Sweden.
Eur. J. Clin. Microbiol. 1, 29-32 (1982)
- 114) Tabaqchali S., O'Farrell S., Nash J.Q., Wilks M.
Vaginal carriage and neonatal acquisition of Clostridium difficile.
J. Med. Microbiol. 18, 47-53 (1984)
- 115) Taylor N.S., Thorne G.M., Bartlett J.G.
Separation of an enterotoxin from the cytotoxin of Clostridium difficile.
Clin. Research 28, 285 A (1980)
- 116) Taylor N.S., Thorne G.M., Bartlett J.G.
Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile.
Infection Immunity 34, 1036-1043 (1981)
- 117) Tedesco F.J.
Antibiotic-associated pseudomembranous colitis with negative proctosigmoidoscopy examination.
Gastroenterology 77, 295-297 (1979)
- 118) Thomas D.F.M., Fernie D.S., Malone M., Bayston R., Spitz L.
Association between Clostridium difficile and enterocolitis in Hirschsprung's disease.
Lancet I, 78-79 (1982)
- 119) Thompson C.M., Gilligan P.H., Fisher M.C., Long S.S.
Clostridium difficile cytotoxin in a pediatric population.
Am. J. Dis. Child. 137, 271-274 (1983)
- 120) Toffler R.B., Pingoud E.G., Burrell M.I.
Acute colitis related to penicillin and penicillin derivatives.
Lancet II, 707-709 (1978)

- 121) Torres J.F., Cedillo R., Sanchez J., Dillman C., Giono S., Munoz O.
Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico.
J. Clin. Microbiol. 20, 274-275 (1984)
- 122) Trnka Y.M., LaMont J.T.
Association of *Clostridium difficile* toxin with symptomatic relapse of chronic inflammatory bowel disease.
Gastroenterology 80, 693-696 (1981)
- 123) Varki N.M., Aquino T.I.
Isolation of *Clostridium difficile* from hospitalized patients without Antibiotic-associated diarrhoea or colitis.
J. Clin. Microbiol. 16, 659-662 (1982)
- 124) Vesikari T., Isolauri E., Mäki M., Grönroos P.
Clostridium difficile in young children.
Association with antibiotic usage.
Acta Paediatr. Scand. 73, 86-91 (1984)
- 125) Viscidi R., Willey S., Bartlett J.G.
Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations.
Gastroenterology 81, 5-9 (1981)
- 126) Viscidi R., Laughon B.E., Yolken R., Bo-Linn P., Moench T., Ryder R.W., Bartlett J.G.
Serum antibody response to Toxins A and B of *Clostridium difficile*.
J. Infect. Dis. 148, 93-100 (1983)
- 127) Vos de N., Mevissen-Verhage E., Harmsen van Amerongen W., Marcelis J.
A new selective medium for the culture of *Clostridia* from human faeces.
Eur. J. Clin. Microbiol. 1, 267-271 (1982)
- 128) Wada N., Nishida N., Iwaki S., Ohi H., Miyawaki T., Taniguchi N., Migita S.
Neutralizing activity against *Clostridium difficile* toxin in the supernants of cultured colostrual cells.
Infection Immunity 29, 545-550 (1980)
- 129) Wald A., Mendelow H., Bartlett J.G.
Non-antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia*.
Ann. Intern. Med. 92, 798-799 (1980)
- 130) Weihrach T.R.
Diagnose und Therapie der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Colitis (PMC).
Hygiene und Medizin 7, 149-151 (1982)
- 131) Welch D.F., Melvin I.M.
Is *Clostridium difficile* pathogenic in infants.
J. Pediatr. 100, 393-395 (1982)
- 132) Wilkins T.D., Lyerly D.L., Sullivan N.M., Mac Donald D.K.
Purification and characterisation of toxin from *Clostridium difficile*.
13th Int. Congress Chemother., Wien 1984, Abstr. Nr. 45, S. 4-6

- 133) Willey S., Bartlett J.G.
Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing
a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin.
J. Clin. Microbiol. 10, 880-884 (1979)
- 134) Wilson K.H., Kennedy M.J., Fekety F.R.
Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a
medium selective for *Clostridium difficile*.
J. Clin. Microbiol. 15, 443-446 (1982)
- 135) Wilson K.
Efficiency of various bile salt preparations for stimulation
spore germination.
J. Clin. Microbiol. 18, 1017-1019 (1983)
- 136) Wood jr. J.S., Bennett I.L., Yardley J.H.
Staphylococcal enterocolitis in chinchillas.
Bull. of the John Hopkins Hosp. 98, 454-463 (1956)
- 137) Wu T.C., McCarthy V.P., Gill V.J.
Isolation rate and toxigenic potential of *Clostridium*
difficile isolates from patients with cystic fibrosis.
J. Infect. Dis. 148, 176 (1983)

Anhang

- 138) Heinzmann W., Hegg P., Liebig B., Botzenhart K.
Nachweis von *Clostridium difficile* und dessen Toxin B
bei Patienten eines Universitätsklinikums
Zbl. Bakt. Hyg. B 182, 25-32 (1985)
- 139) McBee R.H.
Intestinal flora of some antarctic birds and mammals.
J. Bacteriol. 79, 311-312 (1960)
- 140) Rolfe R.D.
Adherence of *Clostridium difficile* to mammalian cells.
Abstracts of the annual meeting of the American Society
for Microbiology (1985) 26
- 141) Stark P.L., Lee A.
The microbial ecology of the large bowel of breast-fed
and formula-fed infants during the first year of life.
J. Med. Microbiol. 15, 189-203 (1982)

